

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIDNEI EMILIO BORDIGNON JUNIOR

**SELEÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS LÁCTICAS**

CURITIBA
2011

SIDNEI EMILIO BORDIGNON JUNIOR

**SELEÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos/Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Dr. Gustavo Henrique Couto

CURITIBA
2011

(TERMO DE APROVAÇÃO)

AGRADECIMENTOS

À escola de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná e, em particular, ao Prof^o. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação e por oportunizar a concretização desta formação acadêmica e de conhecimento.

Ao Governo Brasileiro, através da CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Gustavo Couto pelo apoio, co-orientação, ensinamentos e contribuições experimentais e teóricas deste trabalho.

À querida Mitiyo F. Miyaoka por todo o esforço e dedicação dispensados juntamente neste trabalho, pelas constantes contribuições e apoio pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier por permitir dividir seu conhecimento e orientações, especialmente nas etapas de purificação e caracterização de proteínas.

À Prof^a. Dr^a Vanete Thomaz Soccol por garantir a realização dos procedimentos de biologia molecular e pelas valiosas orientações.

À Prof^a. Dr^a Luciana Porto Souza Vandenberghe pela prestatividade, atenção e por dividir seu conhecimento sempre que solicitado.

À Dr^a. Sascha Habu pelas imprescindíveis contribuições a respeito dos ensaios de atividade antimicrobiana e pelo carinho e atenção dispensados.

Ao Prof^o. Dr. José Luis Parada e Dr^a. Rosália Rubel pela prestatividade na execução de ensaios e discussão de dados.

À Prof^a. Dr^a Jane Mary L.N. Gelinski que orientou meus primeiros trabalhos com bactérias lácticas e atividade antimicrobiana ainda na graduação.

Ao colega de mestrado Jefferson da Luz Costa pela amizade e apoio durante este período de estudos.

Aos melhores colegas de turma Carlos Sanchuki, Denise Naomi Xavier, Alfredo Walter, Siliane Berté, Carolina Perottoni e Mário César Bier, pelo companheirismo e por compartilhar momentos tão agradáveis todo o tempo.

A todos os colegas dos laboratórios LPB 1 e 2 o meu agradecimento pelas trocas de conhecimento, ajudas na execução de procedimentos e, principalmente, pelo convívio e amizade, em especial à Valesca Weingartner, Érika Palú, Michelle Tanoue, Juliana Oliveira, Mara Eli Matos, Suzan Rossi, Cristine Rodrigues, André Melo, Silvana Alban, José Ricardo Carvalho, Felipe Brisk, Gustavo Halfen, Francisco Vítola, Sabrina Poletto, Thaisa Scheuer, Caroline Tiemi, Julio Frison, Gerson Melo, André Lopes, Fernanda Vasconcelos e Leandro Freire.

RESUMO

O setor agroindustrial de produção de carne suína e de frango representa uma importante atividade econômica no Brasil, conta com tendências de crescimento visando suprir a crescente demanda mundial por alimentos e, ao mesmo tempo, sofre com restrições legais quanto ao uso de antibióticos durante o manejo dos animais, resultado de um mercado consumidor mais exigente. Dessa forma, este estudo teve por objetivo selecionar linhagens a partir de isolados bacterianos e leveduras com potencial para a produção de compostos inibitórios ao desenvolvimento das bactérias patogênicas *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, tipicamente responsáveis por infecções gastrointestinais em saúde animal. Fazendo uso da técnica de microdiluição em caldo, o potencial antimicrobiano foi observado inicialmente nos extratos brutos de 39 bactérias ácido-láticas (BAL), a partir de um total de 272 linhagens avaliadas. Avaliações subseqüentes revelaram que dentre estas, dez linhagens apresentavam maior regularidade na síntese dos compostos antimicrobianos e, assim, foram selecionadas. Estudos de indução de produção envolvendo as 10 linhagens selecionadas revelaram que o isolado BAL 027 detinha os maiores percentuais inibitórios, superiores a 50% de inibição para as cinco bactérias indicadoras, e que a produção foi especialmente favorecida na fermentação em co-cultivo utilizando cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cultura indutora. A cinética de produção de compostos antimicrobianos revelou maior atividade ao final da fase exponencial e na fase estacionária de crescimento da cepa produtora. Foram realizados estudos complementares de caracterização da natureza e sensibilidade dos compostos ativos, que apresentaram estrutura essencialmente protéica e supostamente composta por cadeias laterais glicídicas e lipídicas, fundamentais à ação biológica. A estabilidade da biomolécula foi mantida sob pH ácido até 2,0, e parcialmente perdida sob pH alcalino (8,0 – 12,0), bem como houve perda parcial de atividade pela ação da temperatura, em valores acima de 60°C. O tamanho molecular estimado da biomolécula foi próximo a 3,0 kDa, o que representaria um peptídeo com ação antimicrobiana. A caracterização molecular de isolados selecionados foi conduzida através da análise dos fragmentos de restrição do gene 16S(ARDRA) e reações de seqüenciamento genético. A análise dos fragmentos de restrição com a enzima *HaeIII* permitiu observar polimorfismo diante das 10 linhagens de BAL avaliadas, que foram divididas em dois grupos. Através do seqüenciamento genético os gêneros *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. foram reconhecidos, sendo uma linhagem de *L. plantarum* correspondente a cepa BAL 027 de maior interesse nesta pesquisa.

Palavras-chave: bactérias lácticas, antimicrobiano, bacteriocina, antibiótico.

ABSTRACT

The agribusiness production of pork and poultry represents an important economic activity in Brazil benefitting from growth trends due to the growing global demand for food, while simultaneously suffering legal restrictions on the use of antibiotics in animal management, the result of a more demanding consumer market. Thus, this study aimed to select strains from bacterial and yeast isolates with potential for the production of compounds inhibitory to the development of the pathogenic bacteria *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, typically responsible for gastrointestinal infections in animals. Making use of broth microdilution technique, the antimicrobial potential was first observed in crude extracts of 39 lactic acid bacteria (LAB), from a total of 272 strains evaluated. Subsequent evaluations revealed that ten strains showed greater regularity in the synthesis of antimicrobial compounds and these were therefore selected. Studies involving induction of production of 10 selected strains revealed that LAB 027 had the highest inhibitory percentage, always upper than 50% of inhibition against the five sensible bacteria, and that production was especially favored in co-cultivation fermentation using a strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 as inducing culture. The kinetics of production of antimicrobial compounds showed greater activity at the end of the exponential phase and during the stationary growth phase of the producer strain. Additional studies were carried out on the characterization of the nature and sensitivity of the active compounds, which showed a protein structure essentially composed of glucose and lipid lateral chains, which are fundamental to biological action. The stability of the biomolecule was kept under acidic pH until 2.0, and partially lost under alkaline pH (8.0 to 12.0), and there was partially lost by the action of temperature, from 60°C to 121°C heating. The putative molecular size of the biomolecule was close to 3.0 kDa, possibly represented by a peptide with antimicrobial effects. The molecular characterization of selected isolates was by amplified ribosomal DNA restriction analysis 16S(ARDRA) and genetic sequencing reactions. Analysis of restriction fragments using the enzyme *HaeIII* enabled the observation of polymorphism in the selected strains of LAB, which were divided into two groups. Through genetic sequencing the genera *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. were identified, with a strain of *L. plantarum* being of greatest interest to this study (LAB 027).

Keywords: lactic acid bacteria, antimicrobial, bacteriocin, antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição dos controles e amostras em placa de microdiluição.	42
Figura 2 - Ilustração dos resultados de ensaio antimicrobiano em placa de microdiluição.	58
Figura 3 - Valores de absorbância e viabilidade celular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre tratamentos com EDTA.	62
Figura 4 - Avaliação de nisina como controle de inibição dos ensaios antimicrobianos por 24 horas.	65
Figura 5 - Morfologia de colônias da bactéria láctica n. 027 em ágar MRS.	75
Figura 6 - Cinética de fermentação da BAL 027 em cultivo simples e em co-cultivo em caldo MRS.	76
Figura 7 - Cinética de produção de compostos antimicrobianos pela BAL 27 em co-cultivo com <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	78
Figura 8 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre <i>Escherichia coli</i>	79
Figura 9 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.	80
Figura 10 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium.	80
Figura 11 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
Figura 12 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	81
Figura 13 - Atividade antimicrobiana residual após tratamento enzimático.	83
Figura 14 - Perfil protéico de alíquotas de extrato bruto durante a fermentação.	85
Figura 15 - Perfil de estabilidade do extrato bruto da BAL 027 sob diferentes condições de pH.	86
Figura 16 - Perfil de estabilidade do extrato bruto da BAL 027 sob diferentes condições de temperatura.	88
Figura 17 - Eletroforese Tricina-SDS-PAGE de extrato bruto e extratos ultrafiltrados.	92
Figura 18 - Comparativo dos produtos de extração de DNA genômico de bactérias lácticas nos diferentes métodos testados.	95
Figura 19 - DNA genômico extraído através do método MSOP para todas as amostras.	98
Figura 20 - Determinação da quantidade ideal de DNA molde de <i>Salmonella</i> Typhimurium para reação de PCR.	101
Figura 21 - Amplificação da região 16S rRNA das bactérias lácticas.	102
Figura 22 - Amplificação da região 16S rRNA das bactérias indicadoras Gram-negativas e das bactérias lácticas de referência.	102
Figura 23 - Perfis de restrição para a enzima <i>HaeIII</i> sobre bactérias lácticas e Gram-negativas.	103
Figura 24 - Dendograma obtido a partir dos fragmentos da enzima de restrição <i>HaeIII</i>	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de produção da suinocultura brasileira em 2010.	17
Tabela 2 - Prevalência de patógenos causadores de diarreia por idade em suínos.	20
Tabela 3 - Composição dos tratamentos para determinação de sensibilidade a nisina.	39
Tabela 4 - Tratamentos e concentrações finais de EDTA em ensaio antimicrobiano.	40
Tabela 5 - Preenchimento dos poços para ensaio antimicrobiano.	41
Tabela 6 - Condições de fermentação avaliadas para linhagens selecionadas.	45
Tabela 7 - Representação esquemática do procedimento de ultrafiltração.	48
Tabela 8 - Composição da malha de separação para Tricina-SDS-PAGE.	49
Tabela 9 - Sequência de bases nitrogenadas dos iniciadores.	52
Tabela 10 - Índice de inibição correspondentes aos extratos brutos de bactérias lácticas sobre a fase exponencial de crescimento das bactérias indicadoras.	57
Tabela 11 - Índices de inibição correspondentes ao extratos brutos da segunda bateria de fermentações de bactérias lácticas sobre a fase exponencial de crescimento das bactérias indicadoras.	60
Tabela 12 - Comparativo de atividade antimicrobiana na presença e ausência de EDTA.	63
Tabela 13 - Antibiógrama das bactérias indicadoras isoladas de fezes animais.	67
Tabela 14 - Índice de inibição contra <i>Salmonella</i> Enteritidis utilizando diferentes modelos de fermentação.	71
Tabela 15 - Índice de inibição contra <i>Salmonella</i> Typhimurium utilizando diferentes modelos de fermentação.	72
Tabela 16 - Índice de inibição contra <i>Escherichia coli</i> utilizando diferentes modelos de fermentação.	72
Tabela 17 - Índice de inibição contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando diferentes modelos de fermentação.	73
Tabela 18 - Índice de inibição contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 utilizando diferentes modelos de fermentação.	74
Tabela 19 - Percentuais de inibição dos extratos brutos da BAL 027 nos modelos F001 a F007 sobre as bactérias indicadoras.	74
Tabela 20 - Avaliações de extrato bruto e alíquotas obtidas por ultrafiltração.	89
Tabela 21 - Origem dos isolados de BAL selecionadas.	94
Tabela 22 - Análise de concentração e pureza do DNA cromossomal após extrações.	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LPB - Laboratório de Processos Biotecnológicos
ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
UBABEF - União Brasileira de Avicultura
AGE - Assessoria de Gestão Estratégica
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE - Organização Mundial para a Saúde Animal
OMS - Organização Mundial da Saúde
FDA - “*Food and Drug Administration*”
FAO - “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*”
UE - União Européia
NCCLS - “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*”
CLSI - “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”
ATCC - “*American Type Culture Collection*”
ARS - “*Agricultural Research Service Culture Collection*”
PCRBC - Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes
BAL - bactéria ácido-láctica
ETE - *Escherichia coli* enterotoxigênica
AMP - peptídeos antimicrobianos (original: “*antimicrobial peptides*”)
AIP - peptídeos autoindutores (original: “*autoinducers peptides*”)
QS - sensor populacional (original: “*quorum sensing*”)
Bac⁺ - (atividade de) bacteriocina positiva
Bac⁻ - (atividade de) bacteriocina negativa
CIM - concentração inibitória mínima
NIS - nisina
UA - unidades arbitrárias
UAb - unidades de absorbância
U - Unidade enzimática
U/g - Unidade por grama
U/mg - Unidade por miligrama

CE₅₀ - concentração efetiva 50%

kDa - quilo-dalton

UFC - unidades formadoras de colônias

α - alfa

β - beta

pH - potencial hidrogeniônico

°C - graus Celsius

US\$ - dólar

kg - quilograma

g - grama

mg - miligrama

mL - mililitro

μL - microlitro

M - molar

N - normal

mM - milimolar

pmol - picomoles

rpm - rotações por minuto

xg - giros

nm - nanômetro

μm – micrômetro

g/L - gramas por litro

SDS - Dodecil sulfato de sódio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

16S rRNA - 16S Ácido ribonucleico ribossômico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

pb - pares de bases

kb - quilo bases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA.....	16
2.2 MICROFLORA INTESTINAL E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	18
2.3 CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS EM SAÚDE ANIMAL	21
2.4 ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE BACTERIANO	23
2.5 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS	25
2.5.1 Ácidos Orgânicos	26
2.5.2 Peróxido de Hidrogênio.....	26
2.5.3 Diacetil	26
2.5.4 Bacteriocinas.....	27
2.6 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	29
2.6.1 Classe I: Lantibióticos	29
2.6.2 Classe II: Não-Lantibióticos.....	29
2.6.3 Classe III: Proteínas altamente termolábeis.....	30
2.6.4 Classe IV: Bacteriocinas complexas	30
2.7 MECANISMOS DE INDUÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS	30
2.8 MECANISMOS DE SÍNTESE E AÇÃO DAS BACTERIOCINAS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 MICRORGANISMOS.....	35
3.1.1 Cepas avaliadas na triagem.....	35
3.1.2 Bactérias indicadoras	36
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
3.2.1 Obtenção e preparo do extrato bruto	37
3.2.2 Padronização do inóculo para ensaio antimicrobiano	37
3.2.3 Estabelecimento de controle positivo de inibição e sensibilidade à nisina	38
3.2.4 Padronização de EDTA para ensaio antimicrobiano	39
3.2.5 Determinação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo	40
3.2.6 Avaliação da influência do EDTA sobre o índice de inibição.....	43
3.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	43
3.4 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	44

3.4.1 Condições de fermentação	44
3.4.2 Cinética de fermentação	45
3.5 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BIOMOLÉCULA	46
3.5.1 Caracterização da natureza dos compostos ativos	46
3.5.2 Determinação da concentração de proteínas.....	46
3.5.3 Avaliação do efeito da temperatura e pH sobre a estabilidade dos compostos antimicrobianos	47
3.5.4 Fracionamento dos compostos antimicrobianos por ultrafiltração.....	47
3.5.5 Eletroforese de proteínas	48
3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS SELECIONADAS	50
3.6.1 Extração de DNA.....	50
3.6.2 Eletroforese de DNA	51
3.6.3 Determinação da Pureza e Concentração do DNA.....	51
3.6.4 Amplificação do gene 16S rDNA	52
3.6.5 Análise dos fragmentos de restrição do gene 16S-ARDRA	53
3.6.6 Purificação de material amplificado para seqüenciamento	54
3.6.7 Reação de seqüenciamento do gene 16S rDNA.....	54
3.6.8 Análise bioinformática	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1 TRIAGEM E SELEÇÃO DE CEPAS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	56
4.1.1 Padronização e influência de EDTA sobre a atividade antimicrobiana	62
4.2 CARACTERIZAÇÃO DE SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS INDICADORAS	64
4.2.1 Susceptibilidade ao tratamento com nisina	64
4.2.2 Perfil de susceptibilidade a antibióticos	66
4.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS LÁCTICAS	70
4.3.1 Determinação das condições de fermentação	70
4.3.2 Cinética de crescimento celular	76
4.3.3 Cinética de produção de compostos antimicrobianos	77
4.3.4 Perfil de ação antimicrobiana	79
4.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BIOMOLÉCULA.....	82
4.4.1 Caracterização da natureza dos compostos ativos	82
4.4.2 Quantificação de proteínas	85
4.4.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos compostos antimicrobianos	86
4.4.4 Estimativa de tamanho molecular por ultrafiltração.....	89
4.4.5 Eletroforese de proteínas	91

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS.....	93
4.5.1 Extração de DNA.....	94
4.5.2 Concentração e pureza do DNA cromossomal	98
4.5.3 Amplificação do gene 16S rDNA	100
4.5.4 Análise dos fragmentos de restrição do gene 16S-ARDRA	103
4.5.5 Análise de seqüenciamento de DNA.....	105
5 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

As cadeias produtivas da suinocultura e avicultura apresentam constantes avanços no que tange ao manejo intensivo de animais e tecnificação das operações, refletindo-se em uma maior credibilidade de seus produtos. Por outro lado, problemas sanitários ainda permanecem como um grave risco durante o manejo e são responsáveis por grandes perdas econômicas para o setor. As enterites e diarreias são as causas infecciosas mais comuns de mortalidade em leitões, e representam um sério problema também na criação de frangos de corte, especialmente nos recém-nascidos (ALMEIDA *et al.*, 2007; KICH *et al.*, 2008; RUDNIK, 2003).

Após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (1928), na década de 40 os antibióticos começaram a ser utilizados como aditivos na alimentação animal para a cura de animais doentes e a prevenção de determinadas enfermidades. Entretanto, devido ao efeito associado de aumento da produtividade, passou-se a utilizá-los também para obter um crescimento acelerado dos animais. A partir deste momento deu-se início ao uso dos antibióticos como promotores de crescimento, de uso corrente em suínos e aves durante as décadas vindouras (CARDOSO, 2006; BUDIÑO *et al.*, 2006).

Apesar dos antibióticos terem solucionado grande parte dos problemas sanitários presentes nestes modelos de manejo de animais durante décadas, a aquisição de resistência bacteriana às drogas foi apenas uma questão de tempo. Sabe-se que bactérias resistentes a antibióticos podem existir naturalmente em qualquer população e são selecionadas pelo uso contínuo de um agente antimicrobiano, que elimina apenas aquelas sensíveis. A resistência bacteriana é largamente favorecida pelo confinamento de animais, pela presença de alguns vetores, como insetos e pássaros, e, principalmente, quando se faz uso de doses sub-terapêuticas de forma continuada e por longos períodos de tempo, o que permite que as bactérias desenvolvam um mecanismo de sobrevivência ao uso do aditivo alimentar (CARDOSO, 2006).

Além das complicações de tratamento clínico no manejo animal, a resistência bacteriana adquirida representa um fator de risco para a saúde pública quando os mesmos antibióticos de uso veterinário têm alguma aplicação na

terapêutica humana. Neste caso, tratamentos antibacterianos ineficientes podem ser detectados em razão do estabelecimento de populações resistentes nos ambientes hospitalares. Ainda que não comprovado cientificamente, também é preocupante a presença de resíduos de antibióticos na carne animal destinada à alimentação humana, já que pessoas com sensibilidade às drogas poderiam desenvolver reações alérgicas pela ingestão destes produtos.

Motivados por restrições crescentes ao uso de antibióticos na nutrição animal, evento primeiramente observado na Europa ao final da década de 60, pesquisadores têm buscado novas alternativas de combate às infecções bacterianas, seja por exclusão competitiva, como nos casos dos probióticos, seja pela ação de diferentes substâncias antimicrobianas purificadas similares aos antibióticos. As bactérias lácticas surgem neste contexto como uma interessante alternativa de estudo tendo em vista sua flexibilidade para uso como organismo probiótico, pelo emprego das células para aderência, colonização e produção de ácidos orgânicos no trato intestinal; ou ainda pela síntese de proteínas de baixo peso molecular reconhecidas por suas ações bactericidas e/ou bacteriostáticas – as bacteriocinas (VUYST & LEROY, 2007; PARADA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Além das bactérias lácticas, outros microrganismos são relatados como produtores de compostos antimicrobianos similares, como proteobactérias, por exemplo, *Zymomonas mobilis* (LIMA, 2002), espécies de bacilos, principalmente *Bacillus subtilis* (SHELBURNE *et al.*, 2007; CARDOSO, 2006; SCHULZ *et al.*, 2005), e determinadas leveduras relatadas por apresentarem fator *killer* (LEVY *et al.*, 2000).

A busca por novas alternativas eficazes aplicadas ao controle das infecções intestinais na pecuária é evidente e a tendência pelo uso de substâncias naturais sintetizadas por microrganismos parece ser a mais promissora. Atualmente nota-se um mercado consumidor altamente exigente e preocupado com as questões de segurança alimentar e, por isso, a expressiva aceitabilidade destes compostos como suplementos ou aditivos na cadeia produtiva de carnes torna-se fundamental para uma futura aplicação tecnológica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obter biocompostos com ação antimicrobiana ao desenvolvimento de bactérias patogênicas Gram-negativas isoladas de fezes de suínos e aves de corte.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem das culturas lácticas, bacilos e leveduras do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB/UFPR) e selecionar os microrganismos com maior potencial para a produção dos biocompostos de interesse;
- Avaliar a sensibilidade das bactérias Gram-negativas utilizadas como microrganismos-alvo frente aos tratamentos com antibióticos e bacteriocina comercial;
- Determinar as melhores condições de indução para a produção dos biocompostos antimicrobianos;
- Caracterizar a natureza, o tamanho molecular aproximado e a estabilidade das substâncias inibitórias;
- Identificar as principais linhagens selecionadas neste estudo utilizando ferramentas de biologia molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A AGROINDÚSTRIA BRASILEIRA

Determinantes naturais e históricos conduziram ao estabelecimento das atividades agroindustriais no Brasil ao longo de sua história como nação. A abundância de terras agriculturáveis, disponibilidade de recursos hídricos e a necessidade de produção marcam o início destas atividades que, conseqüentemente, são objeto de estudo para aperfeiçoamento e ganhos de produtividade constantemente. O sucesso da agroindústria brasileira deriva da conjugação de fatores como o desenvolvimento de um mercado crescente (interno e externo), abertura comercial suportada por uma estrutura de financiamentos eficientes, e a agregação de tecnologias que permitiram evoluir e tornar nossas atividades competitivas (AGE/MAPA, 2010).

Dentre as atividades do setor primário, a pecuária, e mais especificamente os setores de suinocultura e avicultura, detém hoje importante participação na balança comercial do país e tem estreita ligação com o mercado mundial. O Brasil é reconhecidamente um grande produtor de carne de frango e carne suína, e têm intensificado a participação no mercado internacional visando atender a demanda mundial por alimentos e contribuindo para o crescimento comercial do país.

A suinocultura como atividade industrial tem apresentado crescimento constante desde o ano de 2004 e em 2010 contou com uma população aproximada de 35 milhões de animais, sendo a produção nacional concentrada no Centro-Sul do país, com o estado de Santa Catarina como maior produtor, e o estado do Paraná o terceiro colocado, conforme apresentado na Tabela 01. Em relação às exportações, o mercado brasileiro comercializou 538.930 toneladas de carne suína em um período de 12 meses, compreendido entre Março/2010 e Fevereiro/2011, e representou um mercado de US\$ 1.360.056,00 (ABIEPCS, 2011).

Tabela 1 – Dados de produção da suinocultura brasileira em 2010.

<i>Segmentação da produção</i>	<i>Produção em animais (mil cabeças)</i>	<i>Produção em carne (mil toneladas)</i>
Santa Catarina	8.685	746,9
Rio Grande do Sul	6.926	588,7
Paraná	5.563	478,4
Minas Gerais	4.784	397,1
Outros estados	9.011	734,4
Subtotal atividade industrial	34.969	2.945,5
Subtotal atividade subsistência	4.686	317,2
Total	39.655	3.262,7

Fonte: adaptado de ABIPECS.

No setor de avicultura, o Brasil é o terceiro país em produção mundial e o maior exportador de carne de frango desde o ano de 2004, responsável por 43% do comércio internacional. O mercado, em 2010, obteve produção superior a 12 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 69% comercializada no mercado interno e 31% destinada a exportação. Atualmente, o estado do Paraná responde por 27,7% dos abates de frango no país, consolidando-se como o estado de maior produção, segundo dados do Relatório Anual 2010/2011 da União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2011).

Um estudo realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Assessoria de Gestão Estratégica (AGE), divulgou dados de projeções para a próxima década envolvendo os diversos segmentos e atividades agroindustriais, e entre eles a produção nacional de carnes. Conforme o documento intitulado “Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20”, a carne de frango configurará, entre as carnes, como a maior demanda de produção para o referido período, com a maior projeção de crescimento, cerca de 3,64% ao ano. Ao final do período (2019/20), estima-se que o país deverá produzir aproximadamente 16 milhões de toneladas anuais, e o mercado externo demandará de cerca de 6 milhões de toneladas de carne de frango brasileiro, posicionando o Brasil como o maior exportador, responsável por 70% do mercado mundial. As perspectivas para a suinocultura projetam um crescimento de 2,0% ao ano, com um volume de produção estimado em 3,95 milhões de toneladas em 2019/20 e 16% do comércio mundial de carne suína (AGE/MAPA, 2010).

O interesse acadêmico das instituições de ensino e pesquisa no setor agroindustrial representa a busca de soluções e inovações que permitam suportar tamanho crescimento, gerando desenvolvimento sustentável e conhecimento científico aplicado. Dessa maneira, o presente projeto de pesquisa busca produzir um composto antimicrobiano e oferecê-lo ao setor agroindustrial como uma alternativa ao uso dos antibióticos.

2.2 MICROFLORA INTESTINAL E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

A primeira microbiota que coloniza a flora intestinal no início da vida dos animais, tanto em mamíferos como em aves, tende a aumentar nas primeiras semanas de vida até compor-se basicamente de uma população de bactérias anaeróbicas que, uma vez estabelecida, auxilia nas defesas a infecções no trato digestório. É por este motivo que os animais recém-nascidos, que apresentam baixa diversidade microbiana em sua microflora intestinal, são mais susceptíveis a colonização por patógenos entéricos. Na vida adulta, é comum a todos os animais apresentarem centenas de espécies bacterianas, juntamente com leveduras, fungos e protozoários, habitando o trato intestinal e formando um complexo ecossistema capaz de metabolizar substratos endógenos e exógenos. A numerosa população bacteriana no cólon é normalmente formada por coliformes e diversas espécies de *Lactobacillus* spp. (ZLOTOWSKI *et al.*, 2008). Assim, entende-se que um bom equilíbrio da microflora intestinal reflete um bom estado de saúde do animal (PANCHENIAK, 2005; CARDOZO, 2006).

A criação de animais confinados para fins industriais, apesar de representar um modelo eficiente de produtividade, apresenta maiores riscos quanto à saúde animal. Em granjas de aves, por exemplo, a alta densidade de indivíduos potencializa o risco de contaminações bacterianas, que podem se disseminar rapidamente dada a proximidade entre os animais. Outro fator que pode aumentar a susceptibilidade dos frangos de corte, se comparados a frangos caipiras (ou seja, sem confinamento) é a ausência de um primeiro contato com uma microflora ambiental após a eclosão dos ovos. O animal silvestre recém-nascido adquire naturalmente uma parcela da microflora de bactérias benéficas através do contato do bico, papo ou excrementos da mãe, situação que não ocorre nas incubadoras (CARDOZO, 2006).

Além disso, durante a criação dos animais outros fatores podem desencadear um desequilíbrio desta microflora intestinal e com isso permitir a colonização por agentes patogênicos de risco. Dentre estes fatores estão o emprego indevido de agente antimicrobiano ou o estresse de qualquer natureza no hospedeiro, como por exemplo, jejum alimentar ou hídrico prolongado. Com a colonização por microrganismos patogênicos, há um espessamento da parede intestinal e a redução do tamanho das vilosidades, como mecanismos de defesa do animal. Por consequência, há uma redução na taxa de absorção de nutrientes da alimentação devido ao aumento na velocidade de passagem do alimento e menor área de contato das vilosidades. Tal situação reflete automaticamente em queda no ganho de peso dos animais (CARDOZO, 2006; SILVA, 2008).

No caso dos suínos, as causas infecciosas mais comuns de mortalidade são as enterites e as diarreias, e preocupam os produtores especialmente após o desmame dos leitões (PANCHENIAK, 2005). Entre os agentes etiológicos bacterianos destacam-se *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* verotoxigênica (VTEC) e *Salmonella* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2007). Cepas ETEC são relacionadas a mais da metade dos casos de diarreia neonatal em suínos. A gravidade das contaminações por *E. coli* enterotoxigênica relaciona-se a facilidade de adesão da bactéria à parede do trato intestinal, mediado pelas estruturas filamentosas em sua superfície, as fímbrias, que consequentemente constituem o principal fator de virulência destas cepas. Somado a isso, a produção e liberação de enterotoxinas gera uma mudança na absorção de água e nutrientes no intestino delgado, ocasionando secreções de determinados íons e água e, por fim, um efluxo para o lúmen intestinal e diarreia aquosa (RUDNIK, 2003). Outros patógenos responsáveis pela ocorrência de diarreia em suínos são relacionados na Tabela 02, em função do período de vida dos animais.

Tabela 2 - Prevalência de patógenos causadores de diarreia por idade em suínos.

	Idade (dias)	Principais patógenos
Maternidade	0 – 5	<i>E. coli</i> , <i>Clostridium</i> spp.
Maternidade	6 – 21	<i>Isospora</i> spp., Rotavírus, <i>E. coli</i>
Creche	21 – 60	<i>E. coli</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp., Rotavírus
Recria	60 – 100	<i>Brachyspira</i> spp., <i>Lawsonia</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
Terminação	100 – abate	<i>Brachyspira</i> spp., <i>Lawsonia</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.

Fonte: Adaptado de Zlotowski *et al.*, 2008.

A bactéria *E. coli* é mais relacionada como a causa infecciosa de diarreia neonatal e em leitões desmamados, afetando as fases iniciais de crescimento, enquanto os casos envolvendo o gênero *Salmonella* são comumente relatados em animais com quatro a oito semanas, ou superior. Neste caso as perdas econômicas são ainda maiores, representando grande preocupação do ponto de vista de saúde pública. *Salmonella* serovar Typhimurium é um dos sorotipos mais isolados associados a este tipo de enterite (ALMEIDA *et al.*, 2007; KICH *et al.*, 2008). Outros gêneros são também relatados como agentes causadores de infecções intestinais, porém com menos frequência. Em estudos de identificação de isolados de fezes suínas com quadro clínico de diarreia, Almeida *et al.* (2007) encontraram os seguintes percentuais de bactérias em um universo de 248 amostras: *E. coli* não-enterotoxigênica (32,7%) e enterotoxigênica (27,7%), *Enterobacter cloacae* (9,2%), *Klebsiella pneumoniae* (6,0%), *Citrobacter freundii* (6,0%), *Pseudomonas aeruginosa* (6,0%), *Providencia stuartii* (4,6%), *Klebsiella oxytoca* (3,7%), *Salmonella* spp. (2,8%) e *Proteus vulgaris* (1,3%).

Para o sistema intestinal das aves, a microflora indesejável de bactérias é semelhante e normalmente composta por *E. coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Blastomyces*, *Pseudomonas* e *Salmonella*, que desempenham maior significância como patógenos nas fases iniciais da vida das aves (SILVA, 2008). As salmoneloses, doenças causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, estão intrinsecamente ligadas à produção de frangos de corte e ovos e despertam a atenção pelo grande número de hospitalizações envolvendo consumidores no mundo todo. O gênero *Salmonella* compreende mais de 2.400 sorotipos diferentes,

dos quais cerca de 200 estão relacionados à toxinfecções alimentares, e destes, dois sorotipos apresentam maior virulência, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis, e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium. Outros sorotipos acometem apenas aves domésticas (*Salmonella* sorotipo Gallinarum, por exemplo), ou ainda não produzem doença clínica nas aves, mas são capazes de causar toxinfecções humanas, como *Salmonella* sorotipo Infantis e *S.* sorotipo Heildeberg (GAMA, 2001).

Não há registros estatísticos oficiais sobre os prejuízos econômicos que estas doenças infecciosas geram ao setor produtivo, entretanto, são de conhecimento comum algumas conseqüências diretas dessas patologias, como os gastos excessivos com antibióticos, o aumento da mortalidade e as necessidades de cuidados especiais com os animais doentes e com baixa conversão alimentar.

2.3 CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS EM SAÚDE ANIMAL

O combate aos patógenos bacterianos que afetam o sistema gastrointestinal tem sido realizado nos últimos 50 anos pelo emprego contínuo de antibióticos. Os antibióticos são moléculas biológicas antimicrobianas que atuam através da interação com o organismo-alvo, causando a inibição da síntese da parede celular bacteriana, inibição da síntese de proteínas ou ainda da replicação do DNA (MULVEY & SIMOR, 2009).

Inicialmente usados discretamente na formulação de rações animais, essas drogas hoje são conhecidamente promotores de crescimento e, em muitos casos, presentes durante todo o ciclo de vida de aves de corte (SILVA, 2008). O uso dos promotores de crescimento ocorreu primeiramente em doses inferiores e com resultados satisfatórios como medida terapêutica. Entretanto, no decorrer dos anos o aumento da dose na composição das rações animais tornou-se inevitável em função, principalmente, do aparecimento de cepas resistentes, mas também por resultados produtivos menos favoráveis. Então, o emprego destes se tornou uma medida preventiva e responsável por estímulos que garantiram uma aceleração no crescimento de animais saudáveis (PANCHENIAK, 2005).

A problemática que envolve a questão da resistência bacteriana aos antibióticos de uso corrente na nutrição animal não se limita somente aos prejuízos econômicos, mas também há preocupação com a resistência múltipla adquirida por

certas linhagens e, ainda com maior gravidade, a possível extensão desta resistência bacteriana à terapêutica humana através dos antibióticos de uso em comum na saúde humana e saúde animal.

Um mecanismo de resistência é caracterizado pela sobrevivência de um microrganismo na presença de uma substância inicialmente tóxica, inibitória ao seu desenvolvimento. Segundo Mulvey & Simor (2009), a resistência bacteriana aos antibióticos existe a partir de três princípios: I) resistência cromossomal inata a substratos específicos, por exemplo, todos os estreptococos são intrinsecamente resistentes a gentamicina, porque a sua composição genética resulta em uma parede celular que não permite a acessibilidade desta droga ao sítio de ligação nos ribossomos; II) resistência adquirida por mutação, neste caso ocorrem mutações no DNA bacteriano cromossomal, que adquire uma característica de resistência a alguma droga para a qual era inicialmente susceptível, porém este fenômeno é pouco comum e ocorre a uma frequência de uma mutação a cada 10^7 - 10^{10} bactérias; III) resistência adquirida através de segmentos de DNA transferíveis, como plasmídeos, transposons ou íntegrans. Este é o mecanismo mais grave de transferência de resistência porque se utiliza de elementos genéticos móveis que podem facilmente ser transferidos de um organismo a outro e entre espécies bacterianas. Além disso, múltiplos genes de resistência a antibióticos podem ser transferidos ao mesmo tempo (MULVEY & SIMOR, 2009).

Em todo o planeta surgem discussões evidenciando a necessidade de estabelecer medidas de controle que limitem ou mesmo proíbam o uso de antibióticos em alimentos, especialmente na produção de carne de frango e suína. Órgãos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) e *Codex Alimentarius* têm dado atenção a esta problemática tendo em vista a preservação da saúde pública. Os consumidores são os principais promotores desta mudança à medida que exigem das autoridades e órgãos governamentais o estabelecimento de legislações que priorizem a segurança alimentar.

A União Européia vem adotando medidas de restrição aos antibióticos desde 1986 para a carne animal. Os países pioneiros, Suécia e Dinamarca, implementaram nas décadas de 80 e 90 programas para o controle das prescrições veterinárias, proibição de uso de certas drogas em baixas doses na nutrição animal, e monitoramento da resistência bacteriana (PANCHENIAK, 2005; CASEWELL *et al.*,

2003). Atualmente, o mercado europeu atende ao Regulamento UE N. 37/2010, da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, onde estão discriminadas todas as substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação em função dos limites máximos permitidos de resíduos nos alimentos de origem animal. O mesmo documento traz ainda uma relação das drogas proibidas de uso, entre eles cloranfenicol e nitrofuranos, alegando claramente que resíduos destas substâncias constituem risco para a saúde humana, independente da quantidade presente no alimento (UNIÃO EUROPÉIA, 2010).

De maneira semelhante, a legislação brasileira trata da proibição de uso de cloranfenicol e antibióticos nitrofuranos em carnes destinadas ao consumo humano através da Instrução Normativa Nº 09, de 23 de junho de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Os parâmetros regulamentares à fabricação, ao controle de qualidade, à comercialização e ao emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário são dispostos pela Instrução Normativa Nº 26, de 09 de julho de 2009, do mesmo ministério (BRASIL, 2009). Além disso, os princípios ativos com permissão de uso durante o manejo de animais têm níveis máximos de resíduos estabelecidos para cada antibiótico, entre os quais: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina, clorotetraciclina, amoxicilina, ampicilina e ceftiofur. Todo o monitoramento destes resíduos fica regulamentado pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PCRBC), do Ministério da Agricultura, através da Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999).

2.4 ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE BACTERIANO

A relação entre uso de antibióticos na nutrição animal e o surgimento de culturas bacterianas resistentes que possam ser transmitidas ao homem é complexa e ainda bastante questionada, porém exige medidas cautelosas visando preservar a saúde pública. O combate a cepas multirresistentes, tanto em saúde humana quanto animal, fica dificultado porque as opções de tratamento tornam-se limitadas, e o risco ao organismo infectado evidentemente aumenta. Com isso, teríamos um aumento no número de infecções potencialmente sem-tratamento e que necessitariam de novas alternativas de controle destas populações patogênicas.

Atualmente é possível observar várias linhas de pesquisas biotecnológicas envolvidas na busca de alternativas diferenciadas para o controle das infecções entéricas através do emprego de organismos vivos e/ou substâncias naturais (vegetais ou microbianas) com ação antimicrobiana. Por exemplo, alguns pesquisadores têm avaliado os efeitos da administração oral de óleos essenciais provenientes de extratos vegetais como potenciais promotores de crescimento. Tais extratos contemplariam uma gama de efeitos benéficos a partir dos princípios ativos das plantas já reconhecidos, incluindo a melhoria da digestibilidade por ação enzimática, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante (BARRETO, 2007; OETTING, 2005). Os óleos essenciais agem como suplementos alimentares multifuncionais para animais, entretanto é necessário ainda aperfeiçoar a eficácia destes compostos através de maiores conhecimentos acerca dos mecanismos de ação e os efeitos individuais de cada composto dentro das misturas de formulações (BRENES & ROURA, 2010).

Outra vertente de investigações faz uso de bactérias nativas, que costumeiramente habitam o trato intestinal dos animais, para emprego como células viáveis na função de agentes probióticos, utilizando mecanismos de competição celular entre as espécies em consórcio no sistema gastrointestinal. A atividade probiótica ocorre pela adição de culturas bacterianas às rações animais e tem como consequência o fortalecimento do sistema imune do hospedeiro, uma vez que dificulta a colonização pelos patógenos entéricos (GAGGIA *et al.*, 2010).

Como protagonistas da ação probiótica, um grupo de bactérias se destaca em virtude de sua adaptabilidade em colonizar o sistema gastrointestinal e, em muitos casos, liberar metabólitos com atividade antimicrobiana capaz de controlar as populações bacterianas patogênicas. Estas atribuições referem-se às bactérias ácido-lácticas (BAL), que compõem um extenso gênero de bactérias Gram-positivas, microaerófilas, não esporuladas, sem motilidade, catalase negativas e que geralmente se desenvolvem em colônias pequenas, apigmentadas e com bordas bem definidas. Outras características do grupo referem-se às altas exigências nutricionais, caráter acidófilo e ampla diversidade de habitats, pois se desenvolvem em temperaturas desde 5°C até 45°C. A seguir são relacionados alguns estudos que envolvem as BAL nas aplicações para a saúde animal:

- i) Budiño *et al.* (2005) obtiveram bons resultados na prevenção do aumento de patógenos intestinais em suínos pós-desmame pelo uso de bactérias lácticas como probióticos e, especialmente, quando associadas a prebióticos e simbióticos;
- ii) Pancheniak (2005) investigou a utilização de *Lactobacillus reuteri* LPB-P01-001 como agente probiótico na alimentação de suínos e constatou um efeito similar ao antibiótico, manifestado através de ganho de peso e conversão alimentar durante a fase de creche dos animais;
- iii) Santini *et al.* (2010) promoveram uma triagem entre 55 BAL e bifidobactérias quanto às propriedades probióticas desejáveis para aplicação na produção de frangos de corte, objetivando o controle da bactéria *Campylobacter jejuni*.

Apesar de muitos estudos sugerirem a ação probiótica como uma alternativa para um bom desempenho animal na criação de suínos e frangos isentos de antibióticos, seus efeitos ainda são contraditórios e, por esse motivo, requerem estudos mais aprofundados. Shanahan (2010) sintetiza de forma objetiva as perspectivas futuras para o emprego de probióticos, seja em saúde animal ou saúde humana, da seguinte maneira:

“Probióticos são suplementares à terapia convencional e não substitutos. Sua eficácia é modesta e desuniforme, pois os resultados com uma cepa não podem ser extrapolados a outras, ou em diferentes indicações clínicas. O futuro exige uma maior especificidade na ação probiótica, acompanhado de uma indicação clínica precisa” (SHANAHAN, 2010, p. 1811).

As substâncias naturais sintetizadas por microrganismos constituem ainda outra área de estudos como alternativa ao controle bacteriano em saúde animal. Neste ponto, as BAL são reconhecidamente produtoras de uma diversidade de metabólitos primários e secundários com ação antimicrobiana através dos quais se busca obter produtos purificados ou semi-purificados com alta especificidade e eficiência.

2.5 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

A produção de compostos com ação antimicrobiana das BAL provém primeiramente da ação dos ácidos orgânicos, majoritariamente o ácido láctico, principal metabólito primário desta fermentação, ou a partir de uma série de

compostos secundários associados ao metabolismo bacteriano, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diacetil (2,3-butanodiona), bacteriocinas e outros compostos similares.

2.5.1 Ácidos Orgânicos

O mecanismo de ação dos ácidos orgânicos se vale da redução do pH do meio e difusão facilitada dos ácidos não-dissociados (formas lipofílicas) através da membrana citoplasmática dos organismos-alvo. Com a acidificação do citoplasma celular, dissipa-se a força próton-motora e, por consequência, suprimem-se a síntese enzimática, o sistema de transporte de nutrientes, o metabolismo de aminoácidos e energia e a síntese de material genético (AMMOR *et al.*, 2006; FRANCO, 2009).

2.5.2 Peróxido de Hidrogênio

A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser entendida como um mecanismo de proteção celular à toxicidade do oxigênio. O composto é produzido a partir do cultivo de BAL em condições aeróbicas e acumula-se no meio devido a incapacidade de degradação por estes microrganismos (BAL não produzem a enzima catalase). Tem função antimicrobiana como precursor da liberação de radicais livres bactericidas, como superóxidos (O_2^-) e hidróxidos (OH^-), sendo a ação destes radicais danosa ao DNA bacteriano, à ação enzimática e aos lípidios da membrana citoplasmática, aumentando assim a permeabilidade (BRASHEARS *et al.*, 2005; AMMOR *et al.*, 2006).

2.5.3 Diacetil

O composto aromático característico da manteiga, diacetil, é produto da fermentação do citrato por algumas BAL dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (JAY, 1982). Reconhecidamente, o diacetil tem propriedade antimicrobiana mais efetiva no controle de bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos, do que bactérias Gram-positivas (BRASHEARS *et al.*, 2005).

2.5.4 Bacteriocinas

Historicamente as bacteriocinas foram definidas em 1953, por Jacob e colaboradores, como proteínas bactericidas altamente específicas, de estreito espectro de ação e de adsorção em determinadas células receptoras. Antes disso, Gratia, em 1925, reportou que uma cepa de *Escherichia coli* produziu uma substância em meio sólido com ação antibiótica contra outra cultura de *E. coli*. Esta foi denominada “colicina” (CHEN & HOOVER, 2003). Atualmente, o termo “colicina” fica limitado apenas àquelas proteínas bactericidas produzidas por espécies de *E. coli* ou outros gêneros da família das Enterobacteriaceae, e a denominação bacteriocina é aplicada aos complexos protéicos produzidos por bactérias ácido-láticas, sintetizados nos ribossomos e que possuem mecanismo de ação bactericida ou bacteriostático principalmente dirigido a bactérias Gram-positivas (ALLISON & KLAENHAMMER, 1999; DE MARTINIS & FREITAS, 2003). Mais recentemente, bacteriocinas têm sido referenciadas junto a outros peptídeos antimicrobianos, rotineiramente representados pela sigla AMP's (“*antimicrobial peptides*”), definidos como antibióticos naturais produzidos ribossomicamente por uma ampla variedade de organismos, desde bactérias até plantas e animais. Esta definição inclui todos os peptídeos com função letal a microrganismos, mas não inclui enzimas com atividade hidrolítica, como por exemplo, lisozimas (MAROTI *et al.*, 2011).

O espectro de ação antimicrobiana destas substâncias está normalmente limitado à proximidade, em termos taxonômicos, entre o microrganismo-alvo e o microrganismo-produtor. Isso ocorre porque as bacteriocinas agem contra organismos que competem em um mesmo nicho ecológico (MAROTI *et al.*, 2011). Assim, a ação inibitória de bacteriocinas sobre bactérias Gram-positivas patogênicas (por exemplo, *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp.), ou bactérias Gram-negativas habitualmente patogênicas (por exemplo, *Salmonella* sp., *E. coli*, *Campylobacter* sp.), ou ainda contra fungos e leveduras, é mais rara. Em muitos casos a inibição destes microrganismos se dá somente quando em combinação com outros agentes que induzam alterações na estabilidade e danos a membrana externa das células-alvo. O agente quelante Etileno-diamino-tetra-acetato (EDTA) é o mais utilizado nestas aplicações. Particularmente, o EDTA pode apresentar efeitos antimicrobianos por limitar a disponibilidade de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+} , por

exemplo), que exercem funções como ligantes entre macromoléculas, e assim desestabilizar a membrana celular das bactérias (ECONOMOU *et al.*, 2009). Por outro lado, tratamentos pouco prolongados e/ou em menor concentração do agente quelante permitem introduzir macromoléculas e compostos hidrofóbicos através da membrana externa sem afetar a viabilidade celular (VAARA, 1992).

A nisina, produzida por espécies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é a única bacteriocina comercializada e é conhecida desde 1928, quando foi descoberta na Inglaterra pelos pesquisadores Roger e Whittier (ARAUZ *et al.*, 2009). Sua biossíntese ocorre durante a fase exponencial de crescimento da linhagem produtora e é interrompida quando as células entram na fase estacionária. Estruturalmente, a nisina é um polipeptídeo composto por 34 unidades de aminoácidos, de caráter catiônico e hidrofóbico, e tamanho molecular de 3,5 kDa. São encontradas duas variantes desta bacteriocina, nisina A e nisina Z, sendo que apenas um aminoácido na posição 27 difere as duas formas. Histidina é encontrada na nisina A, enquanto asparagina compõe a nisina Z. Esta diferença não afeta o espectro de ação, mas confere à nisina Z maior solubilidade e difusão entre as moléculas, tornando esta mais atrativa para aplicações industriais (ARAUZ *et al.*, 2009).

O espectro de atividade bactericida da nisina compreende especialmente as bactérias Gram-positivas, incluindo os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* e *Mycobacterium* (ARAUZ *et al.*, 2009). Além disso, também pode ser eficaz no controle *Bacillus cereus* (SHIMIZU *et al.*, 1999) e *Clostridium botulinum* (DAESCHEL *et al.*, 1991). Bactérias Gram-negativas, fungos e vírus não são naturalmente susceptíveis à ação de nisina, exceto quando utiliza-se agentes desestabilizadores da membrana externa (ARAUZ *et al.*, 2009).

Nisina é reconhecida como segura para uso em alimentos com “*status*” GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”), concedido pelo FDA (“*Food and Drug Administration*”, EUA). A Organização de Alimentos e Agricultura & Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) reconheceram a nisina como aditivo alimentar em 1969, tendo, atualmente, aprovação para uso como conservante em alimentos em cerca de 50 países, incluindo o Brasil, onde ela é aprovada para o uso em todos os tipos de queijos e na superfície externa de salsichas de diferentes tipos, podendo ser aplicada como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico

grau alimentício (DE MARTINIS *et al.*, 2002). Para os queijos e também em requeijão, o valor máximo de nisina permitido é de 12,5 mg/kg de alimento, conforme a legislação vigente (BRASIL, 1994; BRASIL, 1996).

2.6 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS

Habitualmente as bacteriocinas têm sido agrupadas segundo suas propriedades bioquímicas em quatro classes, conforme classificação proposta por Allison e Klaenhammer (1999), sendo: classe I (lantibióticos), classe II (não-lantibióticos), classe III (proteínas termolábeis) e classe IV (bacteriocinas complexas) (NES *et al.*, 2007).

2.6.1 Classe I: Lantibióticos

A classe I é composta por pequenos peptídeos antimicrobianos geralmente com tamanho molecular inferior a 5 kDa, caracterizados pela presença incomum dos aminoácidos lantionina e β -metilantionina, e dehidroalanina e dehidrobutirina, que resultam de aminoácidos modificados pós-traducionalmente (ALLISON, KLAENHAMMER, 1999; COTTER *et al.*, 2005).

Os lantibióticos foram originalmente subdivididos em dois grupos, A e B, conforme sua estrutura química e atividade antimicrobiana. Moléculas flexíveis afastadas, com carga positiva e que agem pela despolarização de membrana formando poros na membrana citoplasmática, como exemplos: nisina e lacticina 481. E o tipo B compreende bacteriocinas globulares, de estrutura mais rígida, carregadas negativamente ou sem carga, que tem como mecanismo de ação a interferência do metabolismo celular através de reações enzimáticas (MCAULIFFE *et al.*, 2001; PARADA *et al.*, 2007).

2.6.2 Classe II: Não-Lantibióticos

A segunda classe de bacteriocinas não contém aminoácidos modificados e são normalmente pequenos peptídeos catiônicos (< 10 kDa) de caráter hidrofóbico e termoestáveis. É a maior classe de bacteriocinas e são comumente divididos em três subclasses:

- Subclasse IIa: são os peptídeos ativos contra *Listeria* sp., com uma seqüência N-terminal comum, composta por -*Tir-Gli-Asn-Gli-Val-Xaa-Cis* (CHEN, HOOVER, 2003; DE MARTINIS et al., 2002). São exemplos pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN, curvacina A (DE MARTINIS et al., 2002), enterocina A, mesentericina Y105 e carnobacteriocinas A, BM1 e B2 (ALLISON, KLAENHAMMER, 1999).
- Subclasse IIb: são os peptídeos formadores de poros na membrana celular, compostos por duas subunidades separadas. São exemplos lactacina F, lactococina G e lactococina M (DE MARTINIS et al., 2002).
- Subclasse IIc: são os peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos, como por exemplo, a lactacina B (DE MARTINIS et al., 2002).

2.6.3 Classe III: Proteínas altamente termolábeis

Este grupo é constituído de proteínas termolábeis maiores de 30 KDa. São exemplos helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B (DE MARTINIS et al., 2002).

2.6.4 Classe IV: Bacteriocinas complexas

É o grupo de bacteriocinas mais complexas compostas por uma fração protéica e outras frações lipídicas ou glicídicas. Pertencem a esta classe as bacteriocinas plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1 (DE MARTINIS et al., 2002).

2.7 MECANISMOS DE INDUÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

A síntese de bacteriocinas é um fenómeno ainda pouco elucidado e, na maioria dos casos, reconhecido como um fenótipo instável. Supõe-se que as variáveis ambientais desempenhem uma importante função na regulação da produção destas biomoléculas. Bactérias ácido-láticas possuem sensores específicos que detectam e respondem às alterações ambientais, como condições de osmolaridade, temperatura e disponibilidade de nutrientes, baseados em dois sistemas regulatórios: (a) proteínas histidina-quinase ligadas à membrana, que

monitoram um ou mais fatores ambientais e desencadeiam (b) respostas regulatórias, responsáveis pela modulação da expressão de genes específicos normalmente organizados em “*operons*” (STURME *et al.*, 2007; DOBSON *et al.*, 2007).

Nas bactérias Gram-positivas, estes sensores específicos estão ligados também a resposta de moléculas sinalizadoras envolvidas no “*quorum sensing*” (QS). Este mecanismo de comunicação interna nos procariotos regula um conjunto de genes especializados em resposta a alta densidade celular. Diversos processos fisiológicos são ativados a partir deste comando, como, por exemplo, a biossíntese de antibióticos, fatores de virulência e produção de bacteriocinas. Maldonado *et al.* (2004) relata que a densidade celular, agindo como fator de indução, é captada pelos sensores específicos (histidina-quinase) das BAL, desencadeando uma resposta regulatória capaz de ativar a expressão dos “*operons*” necessários para a síntese, transporte e regulação de bacteriocinas. Dessa forma, entende-se que a densidade celular representa uma condição física capaz de induzir e regular a produção constitutiva de bacteriocinas nas BAL (FRANZ *et al.*, 2000).

O estímulo gerado pelo fator de indução (QS) é transmitido aos sensores específicos pela produção de peptídeos sinalizadores de auto-indução (AIPs – “*autoinducers peptides*”), que normalmente apresentam estrutura similar às bacteriocinas das classes I (lantibióticos) e II (não-lantibióticos) (STURME *et al.*, 2007). Diante das condições experimentais, a produção de AIPs deve atingir um nível suficiente para ativar os sensores específicos, entretanto, o que se observa é que normalmente a produção de AIPs ocorre em baixa concentração, fato que explicaria a instabilidade de síntese das bacteriocinas que habitualmente é observada nos trabalhos experimentais (DOBSON *et al.*, 2007; MALDONADO *et al.*, 2004; FRANZ *et al.*, 2000).

Os genes que expressam a produção de bacteriocinas são dependentes de estímulos externos. Dessa maneira, observa-se que o fenômeno da auto-indução em bactérias ácido-láticas é ativado após o co-cultivo de culturas, uma vez que o ambiente de alta competitividade formado induziria a produção de metabólitos que inibam potenciais competidores (TABBENE *et al.*, 2011). Maldonado *et al.* (2004) obteve produção de bacteriocina a partir de *Lactobacillus plantarum* NC8 somente após co-cultivo com espécies Gram-positivas. Os mesmos autores avaliaram ainda o poder de indução de outras duas formas: primeiro pela adição de células mortas da

cepa indutora sobre *L. plantarum* NC8; e segundo, pela adição de uma porção do sobrenadante livre de células com atividade de bacteriocina (Bac^+), sobre *L. plantarum* NC8. Em ambos os casos houve sucesso na indução de plantaracina NC8. Mais adiante, Ruiz-Barba *et al.* (2010) observaram que a cepa de *L. plantarum* NC8 obteve um incremento de 100% na produção de bacteriocina quando em co-cultivo com *L. lactis* MG1363, em relação à mesma cepa em cultivo simples.

Sturme *et al.* (2007) relataram que a cepa de *L. plantarum* WCFS1 nativa não era produtora de bacteriocina (Bac^-), entretanto a indução foi obtida com o uso de sobrenadante Bac^+ de *L. plantarum* C11 e também pela adição do peptídeo purificado (PInA). Este peptídeo desempenharia a função de competidor como outra bactéria, agindo pelo mecanismo de ativação dos sensores específicos de histidina-quinase.

O perfil competitivo das BAL inseridas em habitats de população diversa, como aqueles encontrados em processos fermentativos espontâneos, ou mesmo no trato gastrointestinal dos animais, por exemplo, naturalmente exige destes microrganismos mecanismos que viabilizem a sua colonização e domínio populacional em relação às outras culturas que também são dotadas da capacidade de sobrevivência sob as mesmas condições ambientais. É através destes estímulos ambientais externos que as reações de resposta regulatória para a produção de bacteriocinas são ativadas. Reproduzir tais condições de competitividade nos ensaios experimentais parece ser o grande desafio quando o objetivo é a produção e liberação de biomoléculas com potencial antimicrobiano no meio de cultivo.

O conhecimento da seqüência genômica das cepas produtoras de bacteriocinas permitem reconhecer as possíveis regiões responsáveis pela produção destas biomoléculas, onde se encontram supostos genes com regiões homólogas àquelas já reconhecidas em outros sistemas regulatórios e de exportação de bacteriocinas bem estabelecidas, como as bacteriocinas da classe II. Os fragmentos contendo os supostos genes então são amplificados por PCR e os produtos da reação são clonados em plasmídeos para serem expressos em organismos-vetores. Avaliações posteriores determinam se aquele fragmento clonado corresponde ao fenótipo esperado, ou seja, a produção de bacteriocina. Alternativamente, peptídeos sintéticos podem ser quimicamente customizados e testados quanto à capacidade de inibição direta ou ainda para indução da produção no caldo de fermentação (DOBSON *et al.*, 2007).

2.8 MECANISMOS DE SÍNTESE E AÇÃO DAS BACTERIOCINAS

A síntese de bacteriocinas ocorre através dos ribossomos e, geralmente, lantibióticos são sintetizados como pré-peptídeos ou precursores, que são enzimaticamente modificados após a tradução (THOMAS *et al.*, 2000). Um modelo de síntese e transporte de lantibióticos citado por Thomas *et al.* (2000) sugere que isto ocorre em três fases: a primeira etapa envolve mudanças intracelulares pós-traducionais que alteram vários resíduos de aminoácidos; na segunda fase, o peptídeo modificado é exportado através da membrana citoplasmática; e, em seguida, a clivagem proteolítica do “peptídeo guia” produz a molécula final com atividade antimicrobiana.

As bacteriocinas são proteínas tóxicas, mas não são letais para as células produtoras devido à co-expressão de proteínas de imunidade (MAROTI *et al.*, 2011). Cada sistema produtor de bacteriocina é caracterizado por um único fator de imunidade que protege as células produtoras de seu próprio efeito bactericida. Segundo Allison & Klaenhammer (1999), são vários os fatores de imunidade já identificados e estudados, que estão baseados, provavelmente, em três diferentes mecanismos, que são: (1) o fator de imunidade pode interagir com o receptor da bacteriocina; (2) o fator de imunidade pode inibir ou bloquear a formação do poro; (3) a bacteriocina pode ser importada e inativada dentro da célula.

As bacteriocinas de BAL compartilham dos mesmos mecanismos de ação sobre as células vegetativas. Este mecanismo está ligado ao esgotamento da força próton-motora das células-alvo através da formação de poros, fato que ocasiona o rompimento da membrana celular e conseqüente liberação dos íons intracelulares (CASTELLANO *et al.*, 2003). Fatores relacionados ao microrganismo-alvo têm influência sobre a ação destas biomoléculas, pois se sabe que células metabolicamente ativas (em cultivo) são mais sensíveis do que células em condições de dormência ou na fase final de multiplicação (THOMAS *et al.*, 2000). No caso da nisina, seu efeito letal é ótimo contra as células em fase de crescimento exponencial (completamente energizadas), uma vez que a energia dispensada para a formação dos poros é suprida pelo microrganismo (THOMAS *et al.*, 2000). Castellano *et al.* (2003) relatam que os resultados do ensaio de mortalidade de *Lactobacillus plantarum* por ação da bacteriocina lactocina 705 foram reforçados

quando as células estavam energizadas, logo, as células menos energizadas também foram sensíveis porém com menos eficiência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

3.1.1 Cepas avaliadas na triagem

Os microrganismos utilizados na triagem para a investigação quanto à capacidade de produção e liberação em meio extracelular de substâncias antimicrobianas foram obtidos do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB), Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (DEBB), da Universidade Federal do Paraná (UFPR). No total foram avaliadas 272 linhagens, sendo destas: 201 cepas de bactérias lácticas, 64 cepas de leveduras e 7 cepas de bactérias do gênero *Bacillus* sp.

A origem das culturas foi bastante diversa e representa, em grande maioria, cepas anteriormente isoladas por outros pesquisadores do departamento, compondo assim um importante banco da microbiota regional e nacional. As linhagens de bactérias lácticas foram isoladas em diferentes ambientes e substratos, como o sistema digestivo e fezes de humanos e de animais (frango, peixe e papagaio), de alimentos, como coco, baru (castanha predominante nas regiões de cerrado do Brasil), café e feijão, ou ainda obtidos a partir de processo fermentativo de vegetais (silagem) e embutidos cárneos. Dentre as leveduras, os gêneros predominantes são *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Lipomyces* sp. e *Pichia* sp., além de leveduras selvagens não identificadas também isoladas a partir de frutos do baru. Quanto a origem dos *Bacillus* sp., quatro foram obtidos do ARS “*Culture Collection – National Center for Agricultural Utilization Research*” – EUA, sendo: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* B-23049, *Bacillus subtilis* NRS-351, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* B-14322, e *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* B-41270. Outros três bacilos foram gentilmente fornecidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), do estado do Paraná. Estes bacilos são identificados como: uma cepa de *Bacillus atrophaeus* lote 02/08, uma cepa de *Bacillus atrophaeus* lote 915 e uma cepa de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

O cultivo das bactérias e das leveduras obedeceu às melhores condições de cultivo específicas em termos de meio de cultura, tempo, disponibilidade de oxigênio e temperatura de incubação, como segue:

- Bactérias lácticas: pré-inóculo e cultivo por 24 horas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), na temperatura de incubação de 30°C em atmosfera microaerófila.
- Leveduras: pré-inóculo e cultivo por 24 horas em caldo “*Yeast Malt*” (YM), em temperatura de incubação de 28°C, em aerobiose estática.
- Bacilos: subdivididos em:
 - Cepas provenientes da Coleção de Culturas ARS: pré-inóculo e cultivo por 24 horas em caldo Nutriente, na temperatura de 30°C, em aerobiose estática;
 - *Bacillus atrophaeus*: pré-inóculo e cultivo por 24 horas em caldo Nutriente, na temperatura de 37°C, em aerobiose estática;
 - *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953: pré-inóculo e cultivo por 12 horas em caldo “*Tryptic Soy Broth*” (TSB), na temperatura de 55°C, em aerobiose estática.

Todas as linhagens foram conservadas em seus meios de cultivo específicos com um exemplar sob refrigeração (4°C) para uso imediato, e sob congelamento em ultrafreezer a -80°C com glicerol 10% para preservação a longo prazo.

3.1.2 Bactérias indicadoras

Cinco bactérias foram usadas como indicadoras de sensibilidade nos ensaios de atividade antimicrobiana a partir das 272 culturas em avaliação. Destas, quatro são Gram-negativas e identificadas a partir dos registros do banco de cepas do LPB como: (1) *Escherichia coli*, (2) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis, (3) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium e (4) *Pseudomonas aeruginosa*. Estas são cepas selvagens oriundas de fezes de suínos e aves de corte que apresentavam sintomas de infecções intestinais, e que foram previamente isoladas e depositadas no banco de cepas do departamento. A quinta cultura utilizada como bactéria indicadora de atividade foi uma cepa de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Apesar de não representar um patógeno

entérico para a saúde animal, esta bactéria Gram-positiva foi inserida aos ensaios para fins comparativos em relação ao espectro de atividade antimicrobiana.

O cultivo das bactérias indicadoras antes dos ensaios de atividade antimicrobiana foi sempre realizado em caldo “*Brain Heart Infusion*” (BHI), à temperatura de 37°C por 12 a 14 horas de incubação. Os microrganismos foram mantidos sob congelamento em *ultrafreezer* a -80°C com glicerol 10% para preservação.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.2.1 Obtenção e preparo do extrato bruto

Inicialmente os microrganismos em avaliação para a produção de substâncias antimicrobianas foram reativados em meio de cultivo líquido, conforme as condições detalhadas no item 3.1.1. Deste cultivo obtinha-se o caldo fermentado base, que foi centrifugado (centrífuga marca FANEM, modelo 203/E) a 3.000 rpm por 30 minutos, para obtenção do sobrenadante livre de células. Na sequência, foi realizado o ajuste de pH do sobrenadante para 6,5 a 6,7, utilizando soluções 5,0 N e 1,0 N de NaOH. Por fim, o sobrenadante foi submetido à filtração em membrana de 0,22 µm (MILLIPORE®), em condições assépticas, para remoção completa das células microbianas ainda presentes. Este caldo fermentado tratado foi denominado de extrato bruto, e mantido sob refrigeração ou congelamento a -20°C até o momento dos ensaios antimicrobianos.

3.2.2 Padronização do inóculo para ensaio antimicrobiano

A padronização dos inóculos das bactérias indicadoras seguiu as orientações da 8ª Edição da Norma Aprovada de Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, do “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” – NCCLS, USA. Dessa maneira, cada linhagem foi individualmente reativada em caldo BHI a partir de um exemplar congelado, por incubação sem agitação durante 16 horas, em estufa bacteriológica a 37°C. Após, foram realizadas sucessivas diluições decimais, em água peptonada a 0,1%, até obter uma leitura de densidade óptica a 630nm (espectrofômetro *Spectrum SP2000*)

entre 0,080 e 0,100, equivalente a solução 0,5 da escala MacFarland. Tal leitura representa, para a maioria das espécies bacterianas, uma suspensão celular com uma população aproximada de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Depois de obter uma suspensão celular padronizada em 0,5 MacFarland de cada bactéria indicadora, prosseguiu-se com mais duas diluições decimais em água peptonada a 0,1%, obtendo assim populações bacterianas de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Estas suspensões celulares foram utilizadas como inóculo nos ensaios antimicrobianos, sendo aplicados 20 µL em cada poço da placa de microdiluição. Dessa maneira, obtinham-se inóculos finais de $2,0 \times 10^4$ UFC/poço de cada bactéria indicadora (NCCLS, 2003).

3.2.3 Estabelecimento de controle positivo de inibição e sensibilidade à nisina

A bacteriocina nisina (Nisaplin, Sigma-Aldrich®) foi avaliada quanto a sua eficácia para limitar o crescimento das cinco bactérias indicadoras, servindo como controle positivo de inibição nos ensaios de atividade antimicrobiana. Para isso foi utilizada uma solução-mãe de nisina na concentração de 10.000 UA/mL diluída em solução a 0,02 N de HCl. A partir da solução-mãe foram distribuídas, em triplicata, quantidades de 20, 30, 40, 50 e 60 µL em poços de placas de microdiluição individuais para cada bactéria. Dessa forma, as doses de nisina empregadas correspondem a concentração total em cada poço de 200 UA (tratamento 1), 300 UA (tratamento 2), 400 UA (tratamento 3), 500 UA (tratamento 4) e 600 UA (tratamento 5), respectivamente. Em seguida, foram adicionados aos poços das placas de microdiluição os volumes complementares de meio de cultivo MRS esterilizado – até totalizar 80 µL –, outros 80 µL de caldo Mueller-Hinton e 20 µL de inóculo padronizado de cada bactéria indicadora, totalizando um volume final de 180µL/poço, conforme esquematizado na Tabela 03.

Tabela 3 - Composição dos tratamentos para determinação de sensibilidade a nisina.

Tratamentos	Concentração de Nisina (UA/mL)	Nisina + MRS	Caldo Mueller-Hinton	Inóculo
1	123,0	20 µL NIS + 60 µL MRS	80 µL	20 µL
2	278,0	30 µL NIS + 50 µL MRS	80 µL	20 µL
3	493,0	40 µL NIS + 40 µL MRS	80 µL	20 µL
4	771,0	50 µL NIS + 30 µL MRS	80 µL	20 µL
5	1.111,0	60 µL NIS + 20 µL MRS	80 µL	20 µL

Após compor os poços para avaliação, as placas de microdiluição foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Os resultados foram determinados ao final do período de incubação pela leitura da absorbância, a 630 nm, em espectrofotômetro tipo leitor de ELISA (BioTek “Power Wave” XS), usando o programa KC Junior. O aumento da densidade óptica de determinada bactéria indicadora, sob uma dada concentração de agente inibitório, indicava resistência do microrganismo ao tratamento. Por outro lado, a ausência ou retardo de incremento da densidade óptica representava sensibilidade ao tratamento.

3.2.4 Padronização de EDTA para ensaio antimicrobiano

Um estudo preliminar aos ensaios antimicrobianos avaliou os efeitos individuais da ação do EDTA sobre a multiplicação da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, escolhida como bactéria indicadora de referência. Nesta avaliação buscou-se determinar a concentração adequada do agente quelante que atuasse como auxiliar para a sensibilização da membrana citoplasmática das células-alvo e, ao mesmo tempo, não exercesse ação inibitória própria. Para isso foram avaliados quatro tratamentos em dois níveis, a partir das soluções de EDTA com concentrações iniciais de 0,1 mM, 1,0 mM, 3,0 mM e 10,0 mM; sob os volumes de 10µL/poço (volume A) e 20µL/poço (volume B). Dessa maneira, foram geradas 8 determinações de atividade antimicrobiana em função da concentração final de EDTA nos ensaios, conforme apresentado na Tabela 04.

Tabela 4 – Tratamentos e concentrações finais de EDTA em ensaio antimicrobiano.

Tratamento	Concentração inicial da solução de EDTA	Concentração final de EDTA no ensaio (mM)	
		Volume A	Volume B
(1)	0,1 mM	0,005	0,011
(2)	1,0 mM	0,055	0,111
(3)	3,0 mM	0,166	0,333
(4)	10,0 mM	0,555	1,111

O volume total de cada poço no ensaio foi de 180 µL, compostos por caldo Mueller-Hinton esterilizado (150 µL em volume A e 140 µL em volume B), solução de EDTA esterilizada (10 µL em volume A e 20 µL em volume B) e inóculo padronizado (20 µL para ambos). Foram feitos controles em branco (substituindo o volume de inóculo padronizado por água destilada esterilizada) e controles de crescimento da bactéria indicadora na ausência de EDTA (substituindo o volume de EDTA por água destilada esterilizada). As avaliações foram realizadas em triplicata e a leitura dos resultados se deu após um período de incubação de 24 horas, a 37°C, através da medida da absorbância (630 nm) e cálculo indireto de viabilidade celular, conforme representado na Equação 01:

Equação 01 – Cálculo de viabilidade celular pela absorbância.

$$V (\%) = \left[\frac{Abs_{630} amostra}{Abs_{630} controle} \right] \times 100$$

Onde:

- V = viabilidade celular, em percentual (%)
- Abs₆₃₀ amostra = leitura de absorbância da amostra com tratamento (A ou B) de EDTA
- Abs₆₃₀ controle = leitura de absorbância do controle de crescimento sem tratamento (A ou B) de EDTA

3.2.5 Determinação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo

Para verificar o potencial de produção de substâncias antimicrobianas extracelulares pelas 272 linhagens avaliadas, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Esta metodologia foi inicialmente proposta por Toba *et al.* (1991) e foi realizada com adaptações, conforme descrito a seguir Para o desenvolvimento dos

ensaios, preferiu-se utilizar placas de microdiluição com fundo redondo, buscando evitar erros nas leituras de absorbância devido ao acúmulo de células nas placas com fundo plano. O volume total de 180µL foi utilizado em cada poço, sendo estes subdivididos em diferentes composições conforme apresentado na Tabela 05.

Tabela 5 - Preenchimento dos poços para ensaio antimicrobiano.

<i>Constituintes</i>	<i>Branco</i>	<i>Controle de inibição</i>	<i>Controle de crescimento</i>	<i>Amostra em avaliação</i>
Caldo Mueller-Hinton	80µL	80µL	80µL	80µL
Caldo MRS ou YM ou Nutriente*	80µL	20µL	80µL	-
Extrato bruto (amostra)	-	-	-	80µL
Nisina (10.000 UA/mL)	-	60µL	-	-
Água destilada esterilizada	20µL	-	-	-
Inóculo padronizado	-	20µL	20µL	20µL
<i>Volume total no poço</i>	<i>180µL</i>	<i>180µL</i>	<i>180µL</i>	<i>180µL</i>

*Conforme o caldo utilizado na fermentação da linhagem para obtenção do extrato bruto.

Em cada placa de microdiluição foram incluídos controle de branco (para descontar os valores de leitura de absorbância provindos das diferentes tonalidades dos meios de cultura), controle de inibição (que permitia observar a ação de um agente inibitório reconhecido) e controle de crescimento da bactéria indicadora (representando a curva de crescimento sob as condições específicas do ensaio). Concluída a composição dos meios de cultivo, a distribuição das amostras através dos extratos brutos e a semeadura das bactérias indicadoras sobre as placas de microdiluição, realizava-se uma leitura inicial da absorbância a 630nm (tempo zero) em espectrofotômetro tipo leitor de ELISA (BioTek “*Power Wave*” XS), usando o programa KC Junior para coleta dos dados. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas. Durante o período de incubação, leituras regulares de absorbância foram realizadas a cada duas horas, a partir de 8 horas do tempo zero, já que nas primeiras oito horas de incubação havia baixo incremento de turbidez correspondente a fase *lag* do crescimento das bactérias indicadoras no ensaio. A média das leituras de absorbância das triplicatas compunha o valor de incremento de densidade óptica das amostras e dos controles. O formato dos resultados se deu pelo índice de inibição (I), estabelecido como o

percentual de redução da população-alvo pela ação de determinado extrato bruto na fase exponencial de crescimento bacteriano, entre 12 e 14 horas de ensaio. O índice de inibição foi calculado conforme a Equação 02 (PORTELLA *et al.*, 2009):

Equação 02 – Cálculo do índice de inibição para ensaio antimicrobiano.

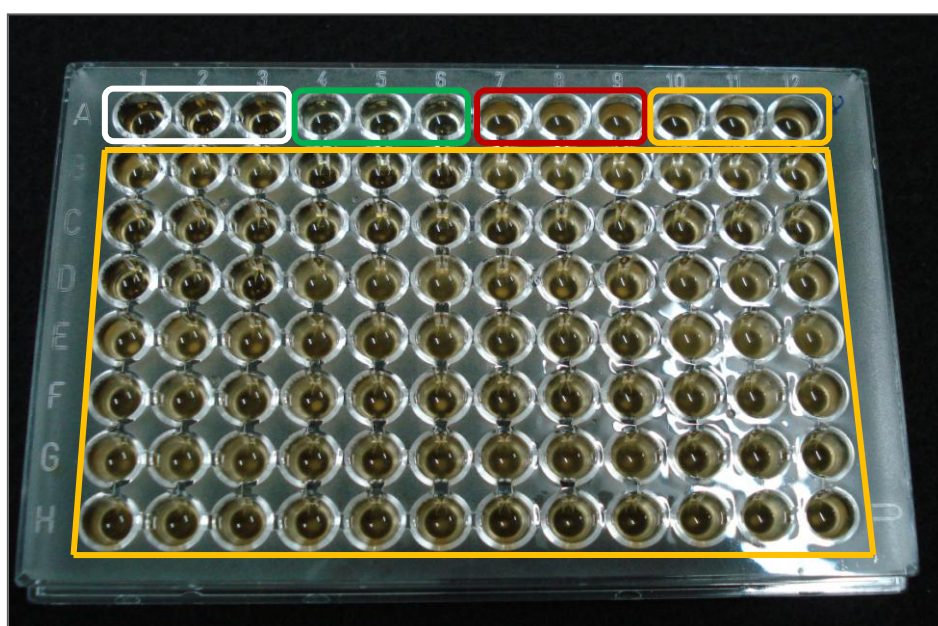
$$I (\%) = \left[\frac{Abs_{630} \text{ controle} - Abs_{630} \text{ amostra}}{Abs_{630} \text{ controle}} \right] \times 100$$

Onde:

- I = índice de inibição da amostra em relação ao controle de crescimento, em percentual (%)
- Abs₆₃₀ controle = leitura de absorbância do controle de crescimento
- Abs₆₃₀ amostra = leitura de absorbância da amostra

Como critério de seleção de linhagens, foi considerada uma concentração efetiva (CE) àquela capaz de inibir, no mínimo, 50% do crescimento bacteriano (CE₅₀). Dessa forma, foram considerados resultados satisfatórios os índices de inibição iguais ou superiores a 50% inibição sobre, pelo menos, uma bactéria indicadora (ROJO-BESARES *et al.*, 2007; OTHMAN *et al.*, 2011). A Figura 01 representa um mapa de distribuição dos controles e das amostras nas placas de microdiluição para realizar os ensaios antimicrobianos.

Figura 1 – Mapa de distribuição dos controles e amostras em placa de microdiluição.



Legenda: **Linha branca:** controle do branco; **Linha verde:** controle positivo de inibição com nisina; **Linha vermelha:** controle negativo de inibição (crescimento padrão); **Linha amarela:** área de distribuição das amostras em triplicata.

3.2.6 Avaliação da influência do EDTA sobre o índice de inibição

Um segundo estudo envolvendo o EDTA nos ensaios antimicrobianos teve por objetivo verificar a contribuição deste composto sobre o índice de inibição de amostras de extratos brutos selecionados na triagem. Assim, estas amostras foram testadas em composição na presença e na ausência de EDTA, frente às cinco bactérias indicadoras (item 3.1.2). A confecção dos poços de amostras e controles nas placas de microdiluição seguiu os mesmos padrões descritos anteriormente na Tabela 05 (item 3.2.5), exceto pela substituição de um volume de 10µL do caldo Mueller-Hinton por 10µL de solução de EDTA 1,0 mM (para presença) ou 10µL de água destilada esterilizada (para ausência). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e os resultados expressos através do índice de inibição conforme a Equação 02 (item 3.2.5).

3.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

As quatro bactérias indicadoras Gram-negativas utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana foram submetidas a avaliações de susceptibilidade a drogas antibióticas. A metodologia utilizada também foi microdiluição em caldo, utilizando técnica automatizada (Vitek[®] – Biomérieux), de acordo com o Manual da Sociedade Americana de Microbiologia (MURRAY *et al.*, 2007) e as normas do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2010). Os antibióticos avaliados neste estudo foram: Amicacina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam (exceto para *P. aeruginosa*), Cefalotina, Cefepima, Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Colistina, Ertapenem (exceto para *P. aeruginosa*), Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam e Tigeciclina. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bacteriologia, do Hospital das Clínicas (HC), Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.4 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

3.4.1 Condições de fermentação

Estudos de fermentação em diferentes condições físico-químicas foram promovidos para as linhagens selecionadas na etapa de triagem e compreenderam os seguintes parâmetros em avaliação:

- *Temperatura de incubação*: 30°C, 15°C e 4°C;
- *Disponibilidade de oxigênio*: microaerofilia (condição obtida pela combustão do oxigênio disponível em jarra de cultivo), aerobiose estática (cultivo em estufa bacteriológica) e aerobiose com agitação (cultivo em agitador tipo *shaker*) com 110 RPM;
- *Disponibilidade de nutrientes*: caldo MRS (composição em g/L: peptona proteose 10.00, extrato de carne 10.00, extrato de levedura 5.00, dextrose 20.00, polisorbato 80 1.00, citrato de amônio 2.00, acetato de sódio 5.00, sulfato de magnésio 0.10, sulfato de manganês 0.05, fosfato dipotássico 2.00), ou caldo Luria-Bertani (LB) formulado a partir de (em g/L): peptona 10.00, extrato de levedura 5.00, cloreto de sódio 5.00;
- *pH inicial do meio de cultivo MRS*: 6,5 (habitual) ou 5,5 (ajustado com solução a 1N de HCl);
- *Influência de cultura indutora*: cultivo simples (quando inoculada somente a linhagem selecionada) ou co-cultivo, ou seja, conjugado com a linhagem indutora de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

As fermentações foram realizadas em tubos de ensaio com volume inicial de 25 mL de meio de cultivo esterilizado, exceto para a avaliação sob agitação em *shaker*, quando foram utilizados frascos *erlenmeyer* de 125 mL de capacidade e com o mesmo volume de meio de cultivo para fermentação. Dessa maneira, foram estabelecidos sete processos fermentativos como detalhados na Tabela 06.

Tabela 6 - Condições de fermentação avaliadas para linhagens selecionadas.

Modelo	Temperatura de incubação	Disponibilidade de oxigênio	Meio de cultivo	pH inicial do meio de cultivo	Forma de cultivo
F001	30° C	Microaerofilia	MRS	6,5	Cultivo simples
F002	30° C	Aerobiose com agitação	MRS	6,5	Cultivo simples
F003	15°C	Microaerofilia	MRS	6,5	Cultivo simples
F004	4° C	Microaerofilia	MRS	6,5	Cultivo simples
F005	30° C	Microaerofilia	MRS	5,5	Cultivo simples
F006	30° C	Aerobiose estática*	MRS	6,5	Co-cultivo
F007	37° C**	Aerobiose estática**	LB	6,5	Cultivo simples

*Aerobiose requerida para permitir o desenvolvimento de *S. aureus* em co-cultivo;

**Condições de disponibilidade de oxigênio e temperatura requerida para o desenvolvimento das bactérias neste meio de cultivo, estabelecidas em estudo prévio de cinética de crescimento em caldo Luria-Bertani (LB).

Todos os processos fermentativos foram iniciados a partir de 2% de inóculo “*overnight*” da cultura produtora sobre o volume inicial (25 mL), considerando que para as fermentações de cultivo simples adicionou-se somente a linhagem em avaliação, e enquanto as fermentações em co-cultivo receberam duas culturas. A linhagem produtora foi inoculada igualmente no tempo zero, e a linhagem indutora após 12 horas, na proporção de 10% do volume inicial de fermentação. O tempo total de fermentação foi de 40 horas, exceto para os modelos F004 e F007, que demandaram um período total de 72 horas. Depois de concluída a etapa fermentativa, os caldos foram submetidos às etapas de preparo de extrato bruto para análise, seguindo a metodologia citada no item 3.2.1. O ensaio antimicrobiano e a expressão dos resultados foram procedidos conforme descrito anteriormente (itens 3.2.4 e 3.2.5).

3.4.2 Cinética de fermentação

Os parâmetros de cinética foram acompanhados durante 48 horas de fermentação e determinados em períodos a cada 6 horas, em duplicata, através da curva de crescimento do microrganismo produtor, medida pela concentração celular

em absorbância a 630 nm, e pelo monitoramento da variação do pH no meio de cultivo. Para determinar a cinética de produção de compostos antimicrobianos foram coletadas alíquotas a cada 12 horas, até 60 horas de fermentação, e avaliadas quanto ao potencial inibitório contra os cinco microrganismos indicadores, conforme descrito previamente nos itens 3.2.4 e 3.2.5.

3.5 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BIOMOLÉCULA

3.5.1 Caracterização da natureza dos compostos ativos

A sensibilidade dos compostos ativos promotores de inibição foi avaliada pela exposição às enzimas proteolíticas pepsina (10 U/mg - VETEC[®]), tripsina de pâncreas suíno (1.120 U/mg, tipo II-S – SIGMA[®]) e proteinase K de *Tritirachium album* (40 U/mg - AMRESCO[®]), além de α -amilase de *Aspergillus oryzae* (~30 U/mg - SIGMA[®]) e lipase de *A. niger* (236 U/g – SIGMA[®]). Alíquotas de 500 μ L do extrato bruto, em duplicata, receberam individualmente soluções enzimáticas na concentração final de 1,0 mg/mL e permaneceram por 2 horas a 37°C, em banho-maria. Uma alíquota de controle permaneceu sob as mesmas condições de incubação, porém sem a adição de qualquer tratamento enzimático. Em seguida, foi realizado ensaio de atividade antimicrobiana com *Salmonella* Typhimurium como microrganismo-alvo, para avaliar se houve perda de atividade inibitória pós-tratamento enzimático (ABRAMS *et al.*, 2011; TODOROV *et al.*, 2010; PASCUAL *et al.*, 2008; MURIANA & KLAENHAMMER, 1991).

3.5.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais presentes nos extratos em análise foi determinado pelo método de Bradford, com leitura em espectrofotômetro a 595 nm, em triplicata para cada amostra (BRADFORD, 1976).

3.5.3 Avaliação do efeito da temperatura e pH sobre a estabilidade dos compostos antimicrobianos

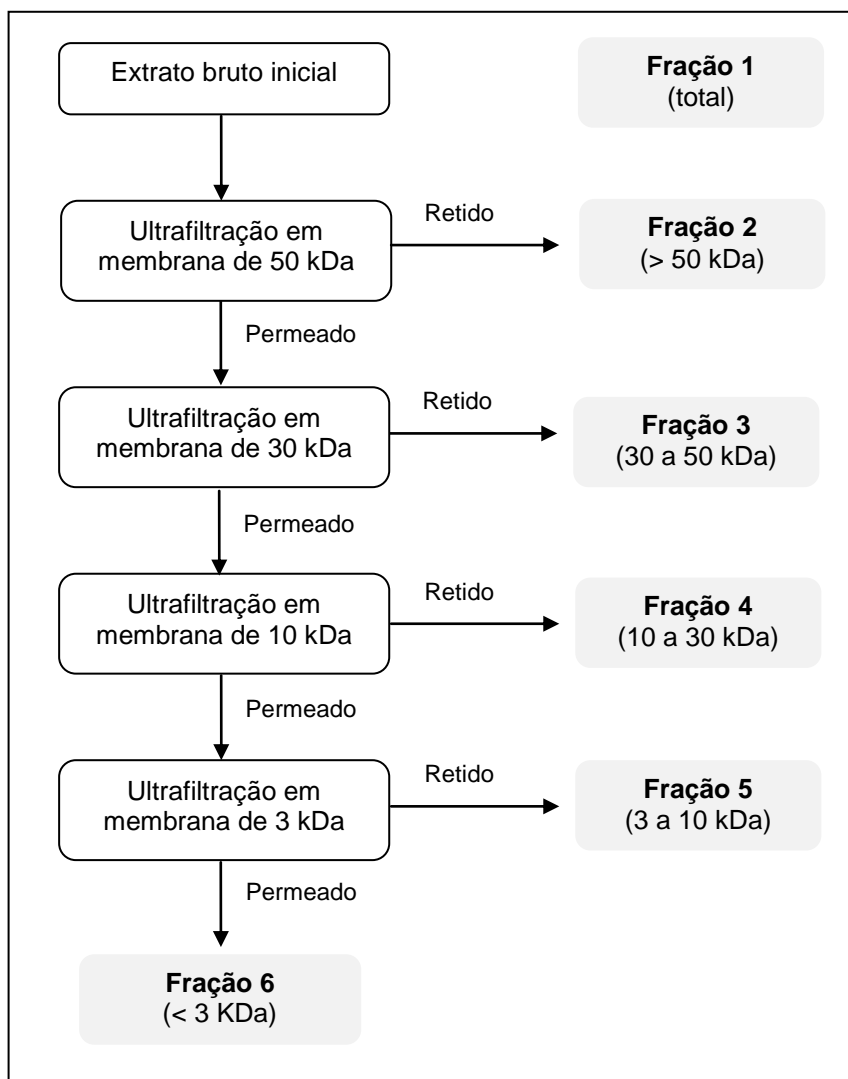
A influência do pH sobre a atividade antimicrobiana foi estudada utilizando-se alíquotas de 500 µL de extrato bruto – inicialmente com pH 6,5 – que receberam, individualmente e em duplicata, ajustes de pH para os valores de: pH 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0. Os ajustes de pH foram realizados utilizando-se soluções esterilizadas a 1N de NaOH e HCl. Uma alíquota-controle permaneceu sob as mesmas condições, porém sem qualquer ajuste de pH. As amostras tratadas permaneceram incubadas, em temperatura ambiente, durante 60 minutos sob os valores de pH de cada tratamento. Ao final do período de incubação, o pH de cada amostras foi novamente ajustado para 6,5 e um ensaio de atividade antimicrobiana foi procedido com as mesmas, utilizando *Salmonella* Typhimurium como microrganismo-alvo, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana remanescente após os tratamentos (ABRAMS *et al.*, 2011; GULAHMADOV *et al.*, 2006).

De maneira semelhante, a estabilidade dos compostos ativos frente a diferentes temperaturas foi avaliada. Alíquotas de 500 µL de extrato bruto, em duplicata, foram incubadas durante 2 horas em banho-maria sob as temperaturas de: 25°C, 37°C, 60°C e 90°C. Além disso, foi testada também a condição de esterilização por autoclave (121°C/1atm/15minutos), o armazenamento sob refrigeração a 4°C por 15 dias, e congelamento a -20°C por 30 dias (ABRAMS *et al.*, 2011; DE KWAADSTENIET *et al.*, 2005). Após os tratamentos, todas as alíquotas foram testadas em relação à atividade antimicrobiana remanescente, conforme citado anteriormente nos itens 2.2.4 e 2.2.5.

3.5.4 Fracionamento dos compostos antimicrobianos por ultrafiltração

Para separar e estimar o tamanho molecular dos compostos ativos presente nos extratos brutos, procedeu-se a sucessivas etapas de centrifugação (centrífuga “Sorvall Legend” MACH1.6R) a 5.000 rpm por 10 a 15 minutos, em ultrafiltros contendo membranas de celulose com porosidade na faixa entre 3 e 50 kDa (Amicon Millipore®). O procedimento foi realizado conforme a Tabela 07, sendo as frações analisadas posteriormente quanto à quantificação de proteínas totais e atividade antimicrobiana remanescente.

Tabela 7 - Representação esquemática do procedimento de ultrafiltração.



3.5.5 Eletroforese de proteínas

A metodologia utilizada para a separação de proteínas a partir das frações obtidas por ultrafiltração foi eletroforese em Tricina-SDS-PAGE, conforme protocolo de Schägger (2006). Esta técnica permite a visualização de proteínas de menor tamanho molecular com maior resolução, pois utiliza íons de tricina ao invés de glicina, do tradicional método Laemmli-SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

A malha de separação de proteínas em gel de acrilamida/bis-acrilamida foi composta por três concentrações conforme descrição da composição desta malha na Tabela 08. A resolução na separação de pequenas proteínas foi incrementada pelo emprego de uréia a 6,0 M na composição do gel de separação (SCHÄGGER, 2006).

Tabela 8 - Composição da malha de separação para Tricina-SDS-PAGE.

Composição	Gel de empilhamento (4% acrilamida)	Gel de espaçamento (10% acrilamida)	Gel de separação (16% acrilamida)
Solução AB-6*	500,0 µl	1,0 ml	3,0 ml
Tampão de gel 3x	1,50 ml	1,65 ml	3,0 ml
Uréia P.A.	-	-	3,24 g
Glicerol P.A.	-	0,5 g	-
Água destilada	4,0 ml	Até 5,0 ml	Até 9,0 ml
Persulfato de Amônio 10%	50,0 µl	100,0 µl	100,0 µl
Reagente TEMED	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl

*Solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida (49,5% T, 6% C).

As amostras foram homogeneizadas em tampão não-desnaturante na presença do corante “*Bromophenol Blue*” e a corrida eletroférica conduzida inicialmente a uma corrente elétrica de 20 mA, até o limite superior do gel de espaçamento. A partir de então, a corrida prosseguiu a 50 mA, até o corante atingir o limite inferior do gel de separação. Para a corrida de eletroforese foi utilizado o sistema “*Mini Protean Tetra System*” (BioRad®).

As bandas de proteínas foram reveladas através da coloração em prata amoniacal, segundo Tunõn & Johanson (1984), com modificações. As etapas que compreenderam a coloração foram: 1) fixação em solução a 50% de metanol, por 20 minutos; 2) Lavagem em água destilada por 10 minutos, seguida de sensibilização com solução a 10% de glutaraldeído (30 minutos); 3) Quatro etapas de lavagem em água destilada, sendo 10 minutos para cada lavagem; 4) Coloração com nitrato de prata por 20 minutos; 5) Lavagem em água destilada (10 minutos), seguida da revelação na presença de ácido acético e formaldeído; 6) Interrupção da revelação usando solução a 1% de ácido acético. Os resultados foram registrados através de imagens obtidas em equipamento transiluminador (L-PIX *Loccus Biotecnologia*®).

3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS SELECIONADAS

3.6.1 Extração de DNA

Alguns métodos de extração foram avaliados quanto à capacidade de lise e obtenção de DNA cromossomal de qualidade dos microrganismos de interesse. O cultivo das linhagens para esta etapa se deu a partir do crescimento “*overnight*” de uma colônia isolada coletada de placas de cultura em estoque. Após intenso crescimento celular, um mililitro do meio de cultivo foi transferido assepticamente para microtubos de 1,5 mL e as células foram precipitadas após centrifugação (centrífuga Micro 14, Fisher Scientific®) a 10.000 rpm por 5 minutos. O procedimento foi repetido para obtenção de maior quantidade de material celular precipitado. Ao final da segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM) pH 8,0. As células foram ressuspensas no tampão, centrifugadas (10.000 rpm/ 5 minutos), o sobrenadante descartado e o precipitado celular preservado como material-base para os distintos protocolos de extração.

Foram testadas cinco metodologias de ruptura através de ação enzimática de lisozima e proteinase K combinadas com solução a 5,0 M de NaCl (AZCÁRATE-PERIL & RAYA, 2001), ruptura por sonicação (MOREIRA *et al.*, 2010), extração por resina chelex 5% com pré-tratamento com lisozima e proteinase K (ROSSETI & GIRAFFA, 2005), combinação de solução a 6,0 M de uréia, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e solução 0,2N de NaOH (SINGH & RAMESH, 2009), e extração pelo método MSOP (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007). O método que apresentou a maior eficiência e qualidade de material genético extraído foi então aplicado a todas as linhagens de interesse.

O procedimento de extração pelo método MSOP foi realizado com modificações, como sendo: as células recuperadas após lavagem com tampão TE foram adicionadas de 100 µL de tampão TES, composto por Tris-HCl a 25 mM (pH 8,0), sacarose a 10%, EDTA a 10 mM e lisozima a 20 mg/mL. Cada microtubo contendo esta solução permaneceu incubado a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 600 µL de tampão de lise, composto por Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0), EDTA a 100 mM, NaCl a 10 mM e SDS a 1%. As células foram gentilmente misturadas ao tampão de lise por inversão e, posteriormente, 10 µL de

solução a 10 mg/mL de proteinase K foram adicionados em cada microtubo, seguido por incubação a 37°C por 15 minutos, e, em seguida, a 80°C por 5 minutos. Após, os microtubos foram resfriados a temperatura ambiente por 10 minutos e 200 µL de solução a 3,0 M de acetato de sódio pH 5,2 foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados por 15 segundo em agitador tipo “*vortex*”, seguida por incubação em gelo por 15 minutos. Após, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos para precipitação das proteínas. Ao final da separação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado foi descartado. O volume de sobrenadante (~600 µL) foi transferido para um novo microtubo, onde recebeu igual volume (1:1) de álcool isopropílico, homogeneizado em “*vórtex*” e mantido a -20°C durante 60 minutos. Então, este volume foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o precipitado foi lavado com 1 mL de álcool etílico a 70%, centrifugado (14.000 rpm / 5 minutos) e, ao final, removido foi inversão. O DNA cromossomal foi seco após 3 horas a 37°C, em estufa bacteriológica. Ao final, o DNA foi solubilizado em 50 µL de tampão TE ou água ultrapura esterilizada.

3.6.2 Eletroforese de DNA

As avaliações dos protocolos de lise celular e conseqüente obtenção de DNA cromossomal, os produtos amplificados resultantes da PCR e os resultados do ARDRA foram analisados em eletroforese horizontal usando gel de ágar ou agarose a 1,3% (DNA cromossomal e produtos amplificados) e 2,0% (ARDRA), em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x, conforme descrito por Sambrock *et al.* (2001). Posteriormente, o DNA foi visualizado após tratamento com Brometo de Etídeo (0,5 µg/mL), em equipamento transiluminador de luz ultravioleta L-PIX (*Loccus Biotecnologia*®). As imagens foram analisadas no software L-PIX *Image*, versão 1.21 (*Loccus Biotecnologia*®).

3.6.3 Determinação da Pureza e Concentração do DNA

A pureza e a concentração do DNA cromossomal obtido nas extrações foram determinadas a partir de uma alíquota diluída 1:100 (5 µL de DNA em 495 µL de água ultrapura), mediante leitura em espectrofotômetro (“*GeneQuant Pro*

RNA/DNA Calculator”) em absorbância a 260nm para quantificação (em µg/mL), e pela razão entre as leituras de 260nm e 280nm, para estimar a pureza.

3.6.4 Amplificação do gene 16S rDNA

Inicialmente estabeleceu-se a quantidade adequada de DNA molde necessária para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ensaios de otimização da concentração de DNA foram realizados tendo como molde o DNA de *Salmonella Typhimurium*, avaliado em diferentes diluições com água ultrapura esterilizada. Foram testadas as seguintes concentrações de DNA molde: (1) sem diluição; (2) em diluição 3:4; (3) em diluição 1:2; (4) em diluição 1:5; (5) em diluição 1:10; (6) em diluição 1:20; (7) em diluição 1:50; e (8) em diluição 1:100. A concentração de DNA que melhor favoreceu a amplificação foi, então, aplicada às demais linhagens de interesse nesta etapa.

O gene 16S rRNA dos microrganismos selecionados foi amplificado pela reação de PCR utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F e 1492R, utilizados para o domínio Bacteria. As sequências dos iniciadores estão apresentadas na Tabela 09.

Tabela 9 - Seqüência de bases nitrogenadas dos iniciadores.

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>	<i>Referência</i>
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	LANE <i>et al.</i> , 1991.
1492R	ACGGCTACCTTGTACGACTT	LANE <i>et al.</i> , 1991.

Para cada reação de PCR, compostas por 20 µL de volume final, foram utilizadas as seguintes proporções: 2,0 µL de tampão 10x; 0,4 µL de dNTP's a 200 mM; 0,65 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 pmol/µL; 0,6 µL de MgCl₂ a 1,5 mmol; 0,3 µL de enzima *Taq platinum* 1,5 unidades (Invitrogen®); 2,0 µL de DNA molde diluído; e 13,4 µL de água ultrapura esterilizada.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Applied Biosystems® modelo “*Veriti 96 Well Thermal Cycler*”), com programação de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 60 segundos (desnaturação), 62°C por 60 segundos (anelamento), e 72°C por 60

segundos (extensão). Por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese horizontal conforme já descrito no item 3.6.2.

3.6.5 Análise dos fragmentos de restrição do gene 16S-ARDRA

A técnica ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal) baseia-se na amplificação do gene 16S rDNA seguido de sua digestão por enzimas de restrição (4 pb de reconhecimento geralmente). O perfil de restrição obtido é particular em função da especificidade da ação enzimática e, por isso, representativo das espécies analisadas (VANEECHOUTTE *et al.*, 1993, VANEECHOUTTE *et al.*, 1995; HEYNDRICKX *et al.*, 1996). Resultados de restrição homólogos aos resultados de fragmentação observados em espécies bacterianas com identidade conhecida permitem agrupar linhagens com alguma similaridade. Neste estudo foram utilizadas como padrões de referência as linhagens *Lactobacillus reuteri* (PANCHENIAK, 2005), *L. acidophilus* ATCC 43121, *L. sakei* ATCC 15521 e *L. curvatus* ATCC 51436.

Para realização do ARDRA os amplificados 16S rDNA foram inicialmente purificados visando a remoção de sais, excesso de nucleotídeos e dNTP's, da seguinte maneira: para cada 20 µL de produto PCR foi adicionado 2 µL de acetato de sódio a 3,0 M pH 4,5 e 40 µL de etanol absoluto gelado. O tubo contendo a mistura foi homogeneizado em "vórtex" seguido por incubação a -20°C por 20 min. A mistura foi centrifugada (centrífuga Micro 14, Fisher Scientific®) a 13.000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi dispensado cuidadosamente. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% seguido por centrifugação (13.000 rpm por 10 min), secagem a temperatura ambiente e ressuspensão em 20 µL de água ultrapura esterilizada.

A técnica ARDRA foi realizada segundo protocolo descrito por Heyndrickx *et al.* (1996) num sistema com volume final de 20 µL formado por: 10 µL do produto PCR (~5 µg de 16S rDNA), 2 µL do tampão fornecido para enzima de restrição, 5 U de enzima de restrição e água ultrapura esterilizada. Quatro enzimas de restrição foram utilizadas neste estudo, sendo: *Sau3AI* (sítio de reconhecimento 5'-GATC-3'), *PstI* (5'-CTGCA'G-3'), *HaeIII* (5'-GG'CC-3') e *AluI* (5'-AG'CT-3'). As digestões foram realizadas a 37°C durante 5 horas. Após inativação da enzima por calor a 65°C durante 15 minutos, as amostras foram aplicadas para corrida eletroforética em gel de agarose 2% preparado com tampão TBE (conforme item 3.6.2). Após

visualização e captura da imagem do gel (conforme Item 3.6.2), o perfil das bandas foi analisado com o programa NTSYS pc (versão 2.1) e os dados foram agrupados com base na matriz de similaridade genética utilizando o método UPGMA (*“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”*).

3.6.6 Purificação de material amplificado para seqüenciamento

Para a remoção do excesso de oligonucleotídeos, dNTP's e sais oriundos da etapa de PCR, 45 µL do produto de PCR foram tratados com 30 µL de acetato de amônio 7,5 M e 90 µL de etanol absoluto, submetido a agitação em vórtex, seguido por centrifugação a 20.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e o precipitado foi lavado com 80 µL de etanol a 70%. Os microtubos foram centrifugados novamente a 20.000 rpm por 15 minutos, e o material genético aderido à parede do microtubo foi preservado após descarte do sobrenadante. Após a completa evaporação do etanol à temperatura ambiente (*overnight*), o precipitado foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura esterilizada.

3.6.7 Reação de seqüenciamento do gene 16S rDNA

O material genético destinado ao seqüenciamento foi submetido então à reação de amplificação na presença de dideoxinucleotídeos fluorescentes com o kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®), separação em eletroforese capilar e detecção do fluoróforo após excitação com laser em seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems®). A reação de amplificação para o seqüenciamento foi realizada num sistema de volume final de 10 µL contendo: 3,0 µL do DNA amplificado purificado (~40 ng), 2,5 µL de água ultrapura esterilizada, 3,0 µL de tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM MgCl₂), 1,0 µL de reagente BigDye Terminator, 0,5 µL de oligonucleotídeos iniciadores a 10 pmol (27F ou 1492R). A programação para amplificação em termociclador compreendeu os seguintes ciclos: etapa inicial a 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O DNA amplificado e marcado foi purificado antes do seqüenciamento pela adição de 10 µL de água ultrapura esterilizada, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e

60 µL de etanol absoluto. A solução foi centrifugada a 20.000 rpm por 15 minutos, e o material precipitado lavado com 500 µL de etanol a 70%, centrifugado (20.000 rpm) por 15 minutos e secado “*overnight*” a temperatura ambiente. Após as amostras de DNA foram solubilizadas em solução tampão com formamida, desnaturadas (96 °C, 5 minutos) e submetidas no seqüenciador automático.

3.6.8 Análise bioinformática

As seqüências do 16S rDNA obtidas foram submetidas “on-line” nos aplicativos “Classifier” e “SEQ MATCH”, pertencentes ao “*Ribosomal Database Project-RDP*” (<http://rdp.cme.msu.edu/>), que abriga um banco de seqüências ribossomais e aplicativos de análise e alinhamento de seqüências 16S rDNA de bactérias e arqueas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TRIAGEM E SELEÇÃO DE CEPAS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Este estudo permitiu identificar, a partir de 272 microrganismos, 39 linhagens com algum potencial antimicrobiano a partir da técnica de microdiluição em caldo. Todas as linhagens positivas pertenceram ao grupo das bactérias lácticas e representaram 14% do número total de culturas analisadas. Não foi observado resultado positivo para os extratos brutos oriundos da fermentação por bactérias do gênero *Bacillus* sp. e por leveduras, bem como para outras 162 culturas lácticas, totalizando cerca de 86% de organismos sem atividade antimicrobiana.

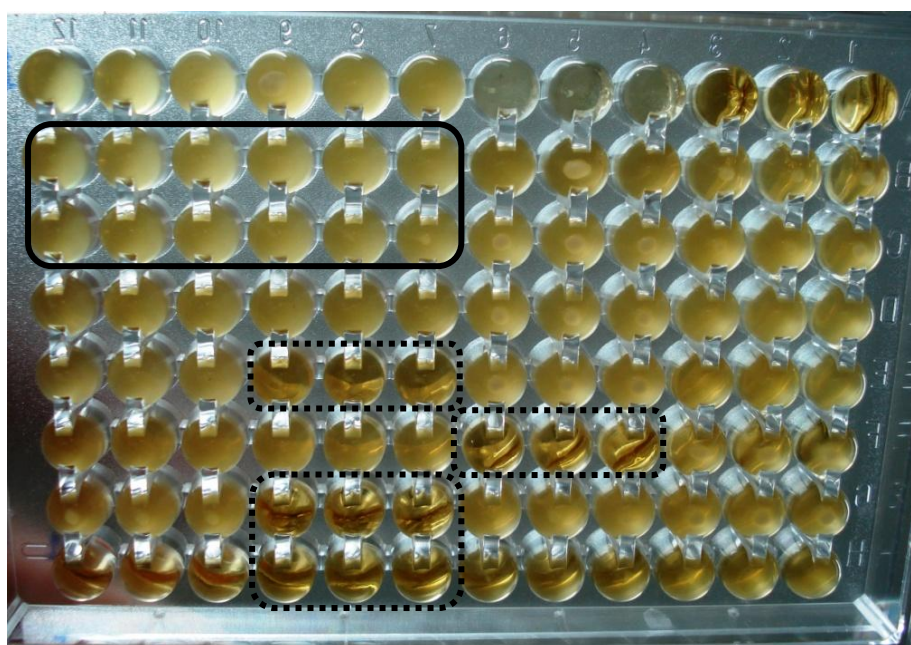
Todos os resultados foram analisados pelo índice de inibição, em percentual, obtidos pela média das leituras espectrofotométricas da absorbância em função do tempo. No Tabela 10 estão listados estes índices correspondentes aos extratos brutos das 39 bactérias lácticas com resultado positivo, em relação a cada uma das bactérias indicadoras utilizadas nos ensaios.

Tabela 10 - Índice de inibição correspondentes aos extratos brutos de bactérias lácticas sobre a fase exponencial de crescimento das bactérias indicadoras.

Código das BAL	Índices de inibição sobre cada bactéria indicadora				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
003	40%	-	42%	-	-
016	40%	87%	93%	92%	-
019	-	98%	99%	97%	-
024	100%	100%	100%	100%	100%
025	-	58%	-	-	-
027	-	72%	96%	91%	-
028	-	100%	100%	100%	-
029	100%	100%	100%	100%	74%
030	64%	100%	100%	100%	-
031	-	-	-	45%	-
032	100%	100%	100%	100%	94%
035	33%	-	-	-	-
037	-	99%	100%	99%	-
038	100%	100%	100%	100%	99%
039	33%	100%	89%	84%	-
040	100%	37%	97%	100%	54%
041	100%	100%	100%	95%	99%
043	24%	99%	100%	100%	10%
045	-	99%	99%	100%	-
048	54%	94%	96%	100%	-
061	-	87%	94%	95%	-
076	-	-	100%	100%	-
083	-	-	100%	100%	-
084	40%	43%	-	-	-
088	-	-	100%	100%	-
092	-	-	-	80%	-
095	-	100%	100%	100%	-
107	-	90%	-	65%	-
110	-	92%	65%	83%	-
111	-	56%	-	-	-
127	98%	90%	81%	100%	97%
129	-	100%	96%	100%	-
133	-	99%	89%	72%	-
138	-	-	100%	100%	-
152	-	75%	64%	-	7%
155	-	69%	64%	-	-
201	-	-	94%	100%	-
224	100%	100%	100%	100%	97%
226	-	95%	77%	-	-

O princípio do método de microdiluição consiste na capacidade de uma dada bactéria-indicadora em multiplicar-se na presença de determinado extrato (amostra em teste) potencialmente inibitório. Leituras regulares de absorbância revelam a multiplicação ou a inibição do crescimento da bactéria-indicadora por turbidimetria, em comparação ao crescimento sem o extrato em avaliação. Na Figura 02 estão apresentados os resultados como são visualizados nas placas de microdiluição, permitindo diferenciar amostras positivas para inibição, representada pelos poços límpidos, e amostras sem inibição, ou seja, com intenso crescimento bacteriano, representadas pelos poços com turbidez aparente.

Figura 2 - Ilustração dos resultados de ensaio antimicrobiano em placa de microdiluição.



Legenda: **linha contínua** = resultados negativos para inibição (presença de turbidez); **linha tracejada** = resultados positivos para inibição (ausência de turbidez).

Aplicando o critério da concentração efetiva 50% (CE_{50}), as linhagens codificadas como 003, 031, 035 e 084 foram desclassificadas por insuficiência de resultados e assim deixaram de ser usadas nos próximos experimentos. Critério de seleção equivalente foi utilizado por ROJO-BESARES *et al.* (2007) para determinações de atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* pela técnica de microdiluição em caldo.

Portanto, os resultados da primeira etapa de triagem permitiram pré-selecionar 35 linhagens de BAL com efetivos potenciais de produção de compostos antimicrobianos contra os patógenos de interesse. Na sequência foram procedidas novas fermentações em caldo MRS com as linhagens pré-selecionadas, respeitando as mesmas condições de inóculo e incubação (tempo / temperatura / disponibilidade de oxigênio) utilizadas anteriormente. Novos extratos brutos foram obtidos para as avaliações de atividade antimicrobiana, sendo os resultados de inibição apresentados através do Tabela 11.

Tabela 11 - Índices de inibição correspondentes ao extratos brutos da segunda bateria de fermentações de bactérias lácticas sobre a fase exponencial de crescimento das bactérias indicadoras.

Código das BAL	Percentual de inibição sobre cada bactéria indicadora				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
016	0%	30%	0%	0%	-
019	-	43%	0%	0%	-
024	0%	52%	0%	0%	0%
025	-	49%	-	-	-
027	-	51%	54%	28%	-
028	-	8%	0%	0%	-
029	0%	31%	32%	0%	0%
030	0%	6%	0%	0%	-
032	0%	49%	47%	0%	0%
037	<u>17%</u>	0%	56%	100%	-
038	0%	54%	0%	0%	0%
039	0%	48%	0%	0%	-
040	0%	0%	78%	100%	0%
041	0%	41%	49%	0%	0%
043	<u>40%</u>	0%	0%	0%	<u>58%</u>
045	-	0%	37%	0%	-
048	0%	24%	0%	0%	-
061	-	0%	90%	22%	-
076	-	-	43%	0%	-
083	-	-	0%	0%	-
088	-	-	38%	0%	-
092	-	-	-	0%	-
095	<u>95%</u>	28%	0%	0%	<u>40%</u>
107	-	0%	-	0%	-
110	-	42%	17%	0%	-
111	-	38%	-	-	-
127	0%	35%	9%	0%	24%
129	-	0%	96%	98%	-
133	-	47%	34%	0%	-
138	-	-	0%	0%	-
152	-	0%	0%	-	0%
155	-	34%	32%	-	-
201	-	-	0%	0%	-
224	100%	60%	26%	0%	<u>100%</u>
226	-	44%	33%	-	-

Os índices de inibição obtidos nesta segunda avaliação (Tabela 11), denominada etapa de confirmação da atividade, foram distintos e mais restritivos do

que os primeiros. De maneira geral, a atividade inibitória foi inferior nesta segunda avaliação e este comportamento ficou comprovado pelos menores índices de inibição obtidos e, em outros casos, pela perda total ou parcial da atividade antimicrobiana (representados na Tabela 11 como 0% - zero). As linhagens n. 083, 092, 107, 138, 152 e 201 não apresentam qualquer potencial inibitório. Por outro lado, em algumas amostras houve incremento de atividade (resultados sublinhados na Tabela 11), sendo estes resultados observados apenas contra *E. coli* (linhagens n. 037, 043 e 095), e contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (linhagens n. 043, 095 e 224).

Considerando tais índices e aplicando o critério de seleção da concentração efetiva (CE₅₀), restaram 10 linhagens selecionadas como as mais promissoras para a produção de compostos com ação antimicrobiana dirigida à bactérias Gram-negativas e *S. aureus* ATCC 25923. As bactérias lácticas selecionadas foram: BAL n. 024, 027, 037, 038, 040, 043, 061, 095, 129 e 224.

Os extratos brutos utilizados na primeira e segunda avaliação foram provenientes de diferentes processos fermentativos que, apesar de padronizados, resultaram em distintos índices de atividade. Algumas hipóteses poderiam sugerir a causa da queda da atividade antimicrobiana entre as amostras avaliadas. Uma das possibilidades é que possa ter ocorrido a adsorção dos compostos ativos à parede celular da cultura produtora. Este fenômeno é relatado por Gonzalés *et al.* (2006) como o fator primário para o declínio da atividade antimicrobiana por subprodutos de BAL. Segundo Yang *et al.* (1992), os protocolos que promovem a separação de células e ajuste de pH apenas do sobrenadante acabam recuperando apenas uma porção do total de compostos ativos do caldo, pois outra parte fica adsorvida às células produtoras e é perdida. O fenômeno da adsorção para compostos antimicrobianos de BAL é dependente do pH e, resumidamente, tem máxima adsorção em pH próximo a 6,0, máxima desorção em pH próximo a 2,0, e são inativados em pH alcalino (YANG *et al.*, 1992). Protocolos que incluam a exposição das células produtoras a um pH ácido para liberar as biomoléculas da parede celular podem resultar em maiores quantidades de compostos de interesse, porém nem sempre o percentual de recuperação é satisfatório (PINGITORE *et al.*, 2007).

Ainda segundo Gonzalés *et al.* (2006), outra possível causa da redução da atividade antimicrobiana seria a anulação parcial ou total da atividade biológica destes compostos em virtude de reações de hidrólise enzimática, provenientes do

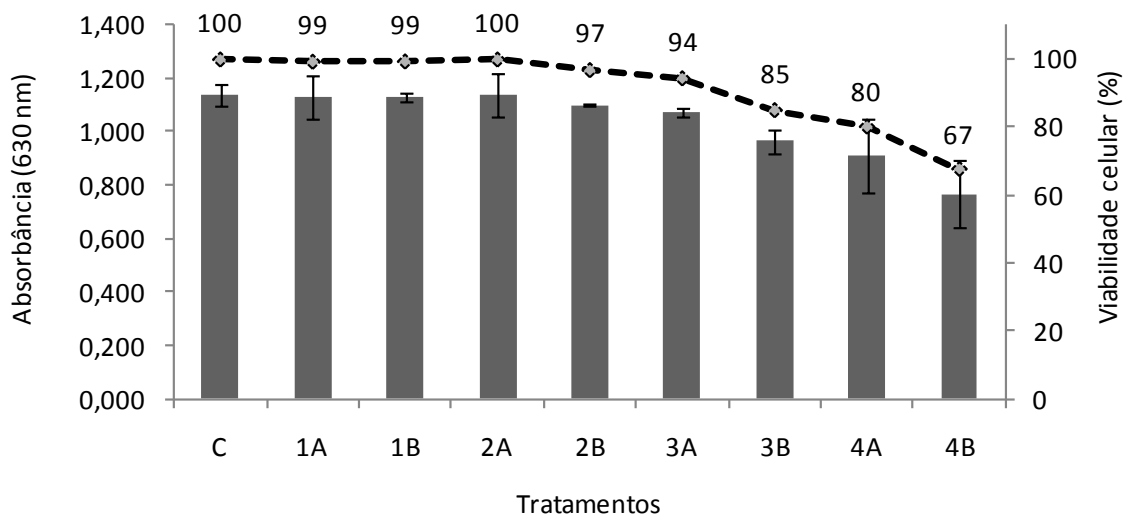
próprio caldo de fermentação, e que neste primeiro momento são dificilmente identificadas por desconhecer a natureza dos compostos antimicrobianos.

Além disso, existe também um fator crítico que habitualmente dificulta a reprodutibilidade de resultados em atividade biológica de caldos fermentados, que é a baixa concentração dos compostos de interesse, pois na maioria dos casos os subprodutos antimicrobianos das BAL são sintetizados em pequenas quantidades pelas linhagens produtoras (PINGITORE *et al.*, 2007).

4.1.1 Padronização e influência de EDTA sobre a atividade antimicrobiana

Inicialmente foi determinada a concentração de EDTA adequada para uso nos ensaios antimicrobianos, conforme descrito na metodologia (item 3.2.4). Os resultados estão representados através da Figura 03.

Figura 3 - Valores de absorbância e viabilidade celular de *Pseudomonas aeruginosa* sobre tratamentos com EDTA.



Legenda: **Tratamentos:** (C) controle sem EDTA; (1A) 0,005 mM de EDTA; (1B) 0,011 mM de EDTA; (2A) 0,055 mM de EDTA; (2B) 0,111 mM de EDTA; (3A) 0,166 mM de EDTA; (3B) 0,333 mM de EDTA; (4A) 0,555 mM de EDTA; (4B) 1,111 mM de EDTA.

As leituras de absorbância indicam que a viabilidade celular foi comprometida a partir do tratamento 2B (0,111 mM de EDTA), seguindo uma tendência decrescente em função do aumento na concentração do EDTA no ensaio, capaz de comprometer até 33% da população de *Pseudomonas aeruginosa* no

tratamento 4B (1,111 mM) apenas por ação do EDTA. Dessa forma, considerou-se que os tratamentos 1A, 1B e 2A não causaram prejuízo à viabilidade celular e, assim, o tratamento 2A (0,055 mM) foi adotado como padrão para a composição dos poços de avaliação de amostras e controles, representando uma alternativa capaz de potencializar a ação de compostos inibitórios presentes nos extratos brutos das BAL.

A partir desta padronização, prosseguiu-se com o segundo ensaio com EDTA em combinação com os extratos brutos das 10 BAL selecionadas, conforme descrito na metodologia (item 3.2.6). Os resultados estão na Tabela 12.

Tabela 12 - Comparativo de atividade antimicrobiana na presença e ausência de EDTA.

Código da cepa	Índices de inibição sobre cada bactéria indicadora									
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i> Enteritidis		<i>Salmonella</i> Typhimurium		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	sem EDTA	com EDTA	sem EDTA	com EDTA	sem EDTA	com EDTA	sem EDTA	com EDTA	sem EDTA	com EDTA
024	-	-	52%	57%	-	-	-	-	-	-
027	-	-	51%	57%	54%	77%	28%	56%	-	-
037	17%	29%	-	-	56%	71%	100%	100%	-	-
038	-	-	54%	80%	-	-	-	-	-	-
040	-	-	-	-	78%	87%	100%	100%	-	-
043	40%	84%	-	-	-	-	-	-	58%	100%
061	-	-	-	-	90%	99%	22%	71%	-	-
095	95%	99%	28%	39%	-	-	-	-	40%	44%
129	-	-	-	-	96%	100%	98%	100%	-	-
224	100%	100%	60%	100%	26%	52%	-	-	100%	100%

Os dados permitem observar que a influência do EDTA foi positiva para a atividade antimicrobiana. Em todas as amostras avaliadas onde a inibição não era total (\neq 100%), houve incremento no índice de inibição, sendo o extrato bruto da linhagem n. 61 aquele que obteve o maior acréscimo, superior a 200%. Estes dados confirmam resultados anteriores verificados por outros autores que, por exemplo, comprovaram que o EDTA agiu sinergisticamente reforçando a ação dos antimicrobianos nisina e lisozima sobre *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, promovendo ação bactericida sobre estes que habitualmente não eram inibidos pela

ação de nisina e/ou lisozima individualmente (BRANEN & DAVIDSON, 2004). Outro estudo mostrou que a população artificialmente contaminada de *E. coli* sobre hambúrgueres congelados foi reduzida após tratamento combinado de EDTA com as bacteriocinas de *Lactobacillus curvatus* e *L. lactis*, além da já comprovada ação *in vitro* destas combinações sobre o desenvolvimento de *E. coli* (CASTELLANO *et al.*, 2011).

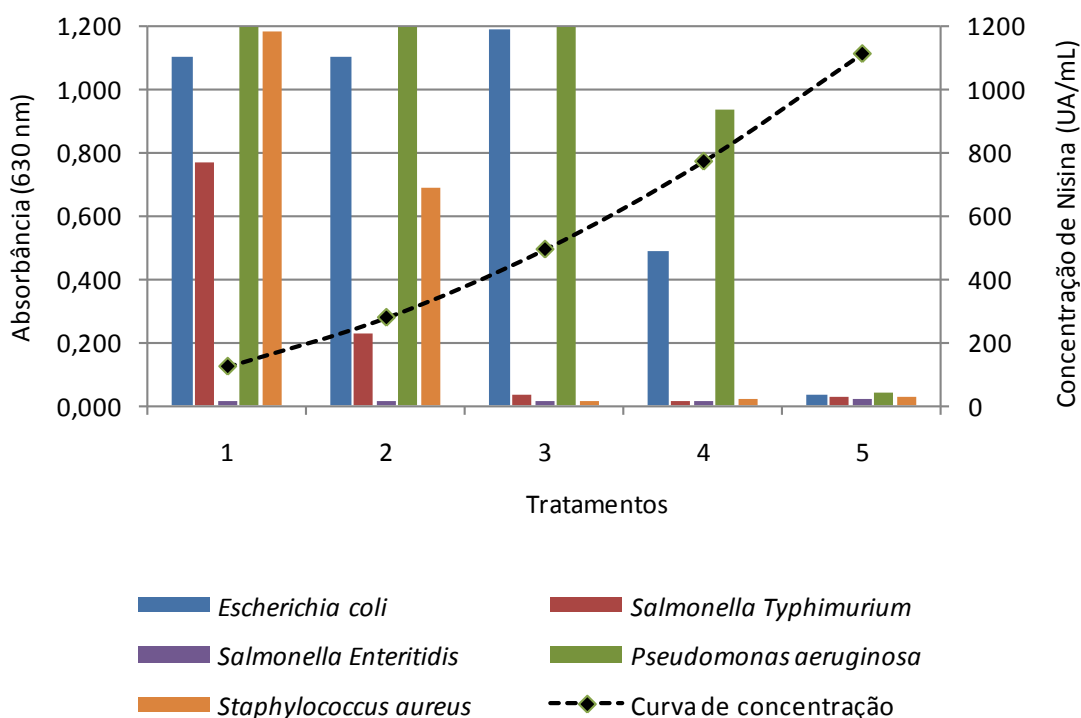
Dessa maneira, ficou estabelecida como satisfatória a adição de solução de EDTA a 1,0 mM nos ensaios de atividade antimicrobiana, possibilitando reforçar o efeito antagonístico proveniente de compostos antimicrobianos presentes nos extratos brutos fermentados por bactérias lácticas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS INDICADORAS

4.2.1 Susceptibilidade ao tratamento com nisina

A concentração de nisina requerida para inibir o desenvolvimento de cada uma das quatro bactérias Gram-negativas e também de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi determinada conforme descrito na metodologia (item 3.2.3), e os resultados do perfil de inibição estão apresentados na Figura 04.

Figura 4 - Avaliação de nisina como controle de inibição dos ensaios antimicrobianos por 24 horas.



A concentração de nisina no tratamento 1 (123 UA/mL) foi capaz de inibir completamente o desenvolvimento de *Salmonella Enteritidis* durante 24 horas de avaliação. Já para as demais bactérias indicadoras, maiores concentrações da substância foram requeridas. Como *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que foram inibidas sob a concentração do tratamento 3 (493 UA/mL), e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que requereram uma concentração ainda superior, correspondente a 1.111 UA/mL de nisina (tratamento 5). Assim, quanto à sensibilidade ao tratamento com nisina, podem-se classificar as linhagens utilizadas neste estudo como sendo *S. Enteritidis* a mais sensível, seguida por *S. Typhimurium*, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* e finalmente, *P. aeruginosa*.

O espectro de ação da bacteriocina comercial nisina é reconhecidamente efetivo contra bactérias Gram-positivas, em virtude de sua natureza e modo de ação (ARAÚZ *et al.*, 2009), entretanto pode ser ampliado no controle de bactérias Gram-negativas quando se faz uso de altas concentrações do agente antimicrobiano, ou promovendo antecipadamente a sensibilização das células-alvo por tratamento com EDTA, por exemplo (PARADA *et al.*, 2007).

Esta avaliação permitiu comprovar ação inibitória de nisina sobre culturas Gram-negativas e com diferentes níveis de susceptibilidade dentro do grupo de bactérias entéricas. Resultados similares foram observados por Branen & Davidson (2004), que relatam comportamentos de sensibilidade diferenciados entre linhagens avaliadas de *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas fluorescens*, a partir de tratamento combinado entre nisina e EDTA. Segundo os autores, a explicação pode ter origem nas diferentes composições da membrana externa ou na estrutura da camada lipoprotéica, que pode ser mais facilmente rompida e assim, permitiria a permeabilidade das substâncias bactericidas com maior efetividade (BRANEN & DAVIDSON, 2004).

4.2.2 Perfil de susceptibilidade a antibióticos

Considerando a singularidade da origem das bactérias Gram-negativas utilizadas neste estudo, julgou-se importante conhecer os perfis de susceptibilidade a certos antibióticos, e entre eles, especialmente aqueles que estão relacionados com o manejo de animais durante a criação. Sendo assim, os resultados apresentados na Tabela 13 representam a concentração inibitória mínima (CIM) de cada droga sobre o desenvolvimento individual das quatro bactérias Gram-negativas, para assim verificar a incidência ou ausência de resistência adquirida “*in vivo*” nestes isolados.

Tabela 13 - Antibiograma das bactérias indicadoras isoladas de fezes animais.

Antibiótico testado	Microrganismo avaliado / CIM (µg/mL)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Amicacina	S (≤ 2,0)	<u>R (≤ 2,0)</u>	<u>R (≤ 2,0)</u>	S (= 4,0)
Ampicilina-Sulbactam	S (= 4,0)	S (≤ 2,0)	S (≤ 2,0)	<u>R (≥ 32,0)</u>
Aztreonam	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	n.a.
Cefalotina	S (= 8,0)	<u>R (≤ 2,0)</u>	<u>R (≤ 2,0)</u>	<u>R (≥ 64,0)</u>
Cefepima	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (= 2,0)
Cefotaxima	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	<u>R (= 32,0)</u>
Cefoxitina	S (≤ 4,0)	<u>R (≤ 4,0)</u>	<u>R (≤ 4,0)</u>	<u>R (≥ 64,0)</u>
Ceftazidima	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (= 4,0)
Ciprofloxacina	S (≤ 0,25)	S (≤ 0,25)	S (≤ 0,25)	S (≤ 0,25)
Colistina	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	S (= 2,0)
Ertapenem	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	n.a.
Gentamicina	S (≤ 1,0)	<u>R (≤ 1,0)</u>	<u>R (≤ 1,0)</u>	S (= 2,0)
Imipenem	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)	S (≤ 1,0)
Meropenem	S (≤ 0,25)	S (≤ 0,25)	S (≤ 0,25)	S (= 0,5)
Piperacilina-Tazobactam	S (≤ 4,0)	S (≤ 4,0)	S (≤ 4,0)	S (= 8,0)
Tigeciclina	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	S (≤ 0,5)	<u>R (≥ 8,0)</u>

(R = resistente; S = sensível; n.a. = não avaliado).

O comportamento observado através do antibiograma revelou que a cepa de *E. coli* foi sensível a todos os tratamentos a que foi submetida, não configurando-se então como uma linhagem que tenha sofrido mutações e/ou adquirido resistência. Por outro lado, as demais bactérias apresentaram comportamentos de resistência a algumas drogas, conforme dados sublinhados na Tabela 13.

O perfil de susceptibilidade de ambas as salmonelas foi idêntico e caracterizado pela resistência a quatro antibióticos: amicacina, cefalotina, cefoxitina e gentamicina. Já o perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou-se ainda amplo, pois foi observada resistência desta bactéria para cinco antibióticos (ampicilina-sulbactam, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina e tigeciclina).

O grupo dos antibióticos β-lactâmicos foram avaliados através de ampicilina (sub-classe aminopenicilina) e piperaciclina (sub-classe ureidopenicilina), combinadas a um agente inibidor de β-lactamases, sulbactam e tazobactam, respectivamente. As ureidopenicilinas possuem habitualmente um espectro de ação maior contra bactérias Gram-negativas, desde Enterobacteriaceae até *Pseudomonas* sp., se comparadas às aminopenicilinas, que são ativas apenas

contra alguns gêneros das Enterobacteriaceae (NCCLS, 2003). Assim, os resultados experimentais são coerentes com estas informações, uma vez todas as cepas foram sensíveis ao tratamento com piperaciclina-tazobactam, enquanto a ação de ampicilina-sulbactam foi efetiva somente sobre as Enterobacteriaceae (*E. coli* e salmonelas), e ineficiente para *Pseudomonas aeruginosa*, naturalmente resistente a esta droga.

As cefalosporinas ou cefens, a segunda classe dos antibióticos β -lactâmicos, também foi avaliada neste estudo fazendo uso de cinco drogas (cefalotina, cefepima, cefotaxima, cefoxitina e ceftazidima). Tradicionalmente subdivide-se esta classe por gerações, conforme o espectro da ação bactericida. A cefalotina pertence às cefalosporinas de primeira geração e sua ação é limitada à *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*, ou seja, não é letal a outras bactérias Gram-negativas. Este comportamento foi confirmado nos resultados deste estudo, já que dentre as quatro cepas Gram-negativas avaliadas, apenas *E. coli* foi sensível a cefalotina. Cefalosporinas de segunda geração, onde está inclusa a cefoxitina, detêm um espectro de ação mais amplo, se comparadas às de primeira geração, porém ainda são pouco eficientes no combate a maioria das enterobactérias (como *Salmonella* sp.), e sem ação contra *P. aeruginosa*, conforme confirmado nos dados experimentais. O gênero *Salmonella* sp. é sensível apenas sob a ação das cefalosporinas de terceira geração, onde se incluem cefotaxima e ceftazidima, e de quarta geração, como cefepima. Todas esses princípios ativos demonstraram capacidade bactericida frente às duas cepas de *Salmonella* sp., caracterizando as cepas avaliadas como habituais quanto a sensibilidade às cefalosporinas. Com relação aos tratamentos em *P. aeruginosa*, as cefalosporinas também resultaram em comportamentos tradicionais, pois houve função antimicrobiana exercida por cefotaxima (única cefalosporina de terceira geração ativa contra *Pseudomonas* sp.), e cefepima, com atividade antipseudomonas reconhecida (GOLAN *et al.*, 2008).

A tigeciclina faz parte de um novo conceito de antibióticos “desenhados” que vêm sendo introduzidos no mercado nos últimos anos, que por sofrerem alterações na estrutura química detêm um espectro de ação bastante amplo, inibindo desde cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos (inclusive Enterobacteriaceae), até bactérias produtoras de β -lactamases. Entretanto, tigeciclina mostra-se inativa contra uma bactéria crítica em saúde pública, que é *Pseudomonas aeruginosa* (LOPES, 2006), resultado observado experimentalmente neste antibiograma.

Finalmente, um grupo de antibióticos denominado de aminoglicosídeos foi avaliado através de amicacina e gentamicina. O espectro de atividade destes antibióticos é bem estabelecido contra bacilos e cocos Gram-negativos aeróbios, entre eles, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Haemophilus* sp., *Acinetobacter* sp. e, inclusive, *Pseudomonas aeruginosa* (GOLAN *et al.*, 2008). Entretanto, parece pouco definido no que diz respeito à *Salmonella* sp.

A interpretação dos resultados de atividade de aminoglicosídeos sobre *Salmonella* sp. é inclusive cautelosa no Manual de Padronização de Resultados para Testes Antimicrobianos de Susceptibilidade, do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI). Pela recomendação deste manual, os resultados de sensibilidade “*in vitro*” não devem ser considerados para tratamentos terapêuticos “*in vivo*”, pois habitualmente estas drogas não são clinicamente efetivas (CLSI, 2011, p. 45). Os laudos de resultados deste estudo trazem comportamentos de resistência (R) para as duas cepas de *Salmonella* sp. sobre estas drogas. Entretanto, os valores de CIM apresentados no antibiograma ($\leq 2,0$ µg/mL para amicacina; $\leq 1,0$ µg/mL para gentamicina) representam originalmente sensibilidade à droga. Para caracterizar resistência, as dosagens requeridas são $\geq 64,0$ µg/mL para amicacina, e $\geq 16,0$ µg/mL para gentamicina. Dessa forma, assume-se que os resultados de resistência (R) observados já estariam considerando as recomendações cautelares do CLSI para tratamentos clínicos e, dessa forma, representam sensibilidade “*in vitro*” das cepas deste estudo à amicacina e gentamicina. Comparativamente, a maioria dos resultados de outras pesquisas científicas recentes com isolados de *Salmonella* sp. reportam que as linhagens são sensíveis a ação de amicacina e gentamicina. Yildirim *et al.* (2011) registraram um pequeno percentual de isolados resistentes a gentamicina (14,7%), e menos ainda para amicacina (2,9%), a partir 68 isolados de carcaças de frango congelado. Oliveira *et al.* (2005) obtiveram apenas 5,5% das 91 linhagens de *S. Enteritidis* avaliadas como resistentes a gentamicina, e Duarte *et al.* (2009) não observaram nenhum resultado de resistência à gentamicina dentre 19 linhagens avaliadas.

Em suma, todos os resultados apontados como “resistência” no antibiograma são restritivos em função do espectro de ação das drogas (resistência natural), ou seja, nenhuma das bactérias Gram-negativas estudadas apresentou indícios de resistência antibiótica adquirida frente às drogas investigadas.

4.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS LÁCTICAS

Habitualmente os compostos antimicrobianos de bactérias lácticas são sintetizados em pequenas concentrações e os mecanismos envolvidos na indução, síntese e transporte destes ao meio extracelular são complexos, específicos em função da cepa produtora, e susceptíveis às condições ambientais encontradas durante o processo fermentativo (PINGITORE *et al.*, 2007). Assim, investigar alternativas para incrementar o teor de compostos produzidos no caldo de fermentação se constituiu como ponto essencial para determinações posteriores. Parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio durante a incubação, além da concentração de glicose no meio de cultivo e o tamanho de inóculo, podem ter influência na regulação e síntese destas biomoléculas (GONZALÉS *et al.*, 2006; LEAL-SÁNCHEZ *et al.*, 2002).

4.3.1 Determinação das condições de fermentação

A capacidade de incrementar a produção de compostos inibitórios em relação às concentrações obtidas inicialmente foi avaliada através dos modelos de fermentação (F001, F002, F003, F004, F005, F006 e F007) conforme descrito nos métodos (item 3.4.1). Cada modelo foi reproduzido a cada uma das 10 cepas de BAL selecionadas, totalizando 70 experimentos de fermentação. Cada extrato bruto oriundo destas 70 fermentações foi avaliado para os cinco microrganismos indicadores, gerando 350 medições de atividade antimicrobiana. Para a apresentação dos resultados, os valores de índice de inibição estão agrupados por microrganismo indicador, nos Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18, que seguem.

Tabela 14 - Índice de inibição contra *Salmonella* Enteritidis utilizando diferentes modelos de fermentação.

Código da cepa	Modelos de fermentação						
	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007
024	43%	13%	35%	53%	50%	56%	12%
027	79%	22%	45%	34%	<u>74%</u>	<u>99%</u>	23%
037	-	-	-	31%	53%	63%	-
038	39%	25%	55%	29%	<u>69%</u>	61%	24%
040	-	-	-	47%	55%	52%	-
043	-	-	-	52%	56%	54%	-
061	-	-	-	53%	48%	66%	-
095	49%	32%	44%	50%	60%	44%	27%
129	-	-	-	52%	59%	54%	-
224	36%	7%	19%	66%	53%	<u>70%</u>	19%

Dentre os modelos de fermentação apresentados, F001 tem função de controle pois reproduz as condições iniciais de cultivo para obtenção dos extratos brutos utilizados nas avaliações anteriores. Assim, quanto ao perfil inibitório frente a *Salmonella* Enteritidis, pode-se dividir os demais modelos em dois grupos comparativamente a F001, sendo: (a) condições pouco favoráveis ou desfavoráveis à produção de compostos antimicrobianos – compreende os modelos F002, F003 e F007; (b) condições favoráveis ou indutoras à produção de compostos antimicrobianos – abrange os modelos F004, F005 e F006. No primeiro grupo (a), os índices de inibição obtidos não superaram os parâmetros iniciais de F001 e, ainda, foram sempre inferiores, representando um menor poder bactericida. Em contrapartida, os índices de inibição provenientes do segundo grupo (b) foram majoritariamente superior ou próximo aos índices iniciais. Algumas linhagens que não possuíam ação antimicrobiana contra *S. Enteritidis* apresentaram esta característica a partir do cultivo nos modelos de fermentação F004, F005 e F006. É o caso das linhagens n. 037, 040, 043, 061 e 129. Os maiores índices de inibição foram observados para as fermentações com pH inicial do meio de cultura ajustado em 5.5 (F005) – em destaque BAL n. 027 (74%) e n. 038 (69%) – e fermentação em co-cultivo entre a bactéria láctica e *Staphylococcus aureus* (F006) – em destaque BAL n. 027 (99%) e n. 224 (70%).

Tabela 15 - Índice de inibição contra *Salmonella* Typhimurium utilizando diferentes modelos de fermentação.

Código da cepa	Modelos de fermentação						
	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007
024	-	-	-	48%	65%	66%	-
027	74%	36%	38%	32%	63%	<u>99%</u>	27%
037	30%	21%	25%	37%	<u>71%</u>	68%	40%
038	-	-	-	43%	62%	63%	-
040	30%	-	-	46%	64%	53%	7%
043	-	-	-	52%	53%	62%	-
061	39%	22%	41%	59%	<u>70%</u>	<u>70%</u>	31%
095	-	-	-	40%	68%	60%	-
129	25%	-	-	50%	64%	62%	14%
224	43%	15%	28%	48%	<u>70%</u>	<u>70%</u>	30%

Os resultados de inibição para *Salmonella* Typhimurium foram similares aos resultados observados para *S. Enteritidis*. Da mesma forma, os modelos F002, F003 e F007 não promoveram maior produção de compostos antimicrobianos em relação ao controle (F001), enquanto F004, F005 e F006 representaram as condições mais favoráveis e com os maiores índices de inibição, presentes em todas as linhagens avaliadas. Como destaques no modelo F005 estão: BAL n. 037 (71%), n. 061 e 224 (70%). Os maiores potenciais inibitórios a partir do modelo F006 foram: BAL n. 027 (99%), n. 061 e 224 (70%).

Tabela 16 - Índice de inibição contra *Escherichia coli* utilizando diferentes modelos de fermentação.

Código da cepa	Modelos de fermentação						
	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007
024	-	-	-	-	15%	-	-
027	-	-	-	21%	36%	<u>63%</u>	-
037	35%	-	-	-	-	-	-
038	-	-	-	-	-	-	-
040	-	-	-	-	-	-	-
043	26%	-	-	-	-	-	-
061	-	-	-	-	-	-	-
095	31%	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	-	-	-
224	32%	-	-	-	-	-	-

A bactéria indicadora *Escherichia coli* demonstrou-se mais resistente a ação dos extratos brutos e, dessa forma, poucos índices de inibição foram observados. Em geral, as fermentações correspondentes ao controle (F001) produziram quantidades de compostos antimicrobianos inferiores aos dados experimentais anteriores. Dentre os modelos de fermentação F002, F003 e F007, nenhuma produção foi verificada. Houve síntese de compostos antimicrobianos apenas pela BAL 024, com pequeno índice (15%) sob F005, e BAL 027, onde foi possível detectar inibições em F004, F005 e F006. Entretanto, apenas quando fermentada em co-cultivo (F006), produziu quantidade superior ao limite de CE₅₀ (63% de inibição).

Tabela 17 - Índice de inibição contra *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes modelos de fermentação.

Código da cepa	Modelos de fermentação						
	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007
024	-	-	-	-	-	-	-
027	42%	-	-	-	40%	<u>94%</u>	23%
037	21%	-	-	-	-	12%	-
038	-	-	-	-	-	-	-
040	20%	-	-	-	-	-	-
043	-	-	-	-	-	-	-
061	32%	-	-	-	-	-	-
095	-	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-

Considerando *Pseudomonas aeruginosa* como bactéria indicadora, os resultados assemelharam-se àqueles de *E. coli* e apenas BAL 027 apresentou índice de inibição efetivo (94%), estimulado pela fermentação em co-cultivo. Esta mesma cultura láctica manteve-se como maior potencial ainda contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – com 52% de inibição, quando utilizado extrato bruto de mesma origem (F006). Outros índices de inibição foram observados a partir de extratos brutos de algumas linhagens de BAL, para ambas as bactérias indicadoras, porém sempre inferiores a CE₅₀.

Tabela 18 - Índice de inibição contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923 utilizando diferentes modelos de fermentação.

Código da cepa	Modelos de fermentação						
	F001	F002	F003	F004	F005	F006	F007
024	-	-	-	-	-	-	-
027	-	-	-	-	32%	<u>52%</u>	-
037	-	-	-	-	-	-	-
038	-	-	-	-	-	-	-
040	-	-	-	-	-	-	-
043	33%	-	-	-	-	-	22%
061	-	-	-	-	-	-	-
095	48%	-	14%	-	-	-	19%
129	-	-	-	-	-	-	-
224	28%	-	-	-	-	-	22%

A BAL 027 foi a linhagem que apresentou o maior potencial para a produção de compostos antimicrobianos dentre as dez cepas avaliadas, uma vez que foi a única com ação inibitória superior a 50% sobre os cinco microrganismos indicadores testados. A produção de compostos antimicrobianos parece ter sido especialmente induzida no modelo F006, pela presença de uma cultura secundária no mesmo meio de fermentação. Através da Tabela 19, onde estão condensados apenas os resultados de inibição da BAL 027 em cada modelo de fermentação e sobre as cinco bactérias indicadoras, verifica-se que o modelo F006 foi o que apresentou os maiores acréscimos nos índices de inibição em relação ao padrão F001.

Tabela 19 - Percentuais de inibição dos extratos brutos da BAL 027 nos modelos F001 a F007 sobre as bactérias indicadoras.

Modelos de fermentação	Microrganismos indicadores				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
F001	39%	79%	74%	42%	-
F002	-	22%	36%	-	-
F003	-	45%	38%	-	-
F004	21%	34%	32%	-	-
F005	36%	74%	63%	40%	32%
F006	<u>63%</u>	<u>99%</u>	<u>99%</u>	<u>94%</u>	<u>52%</u>
F007	-	23%	27%	23%	33%

Dessa forma, tomou-se o modelo de fermentação denominado F006, obtido pelo cultivo conjunto entre bactéria láctica e cultura de *S. aureus*, como a condição mais favorável à produção de compostos antimicrobianos pela BAL 027. A morfologia das colônias da bactéria láctica selecionada está ilustrada através da Figura 05.

Figura 5 - Morfologia de colônias da bactéria láctica n. 027 em ágar MRS.



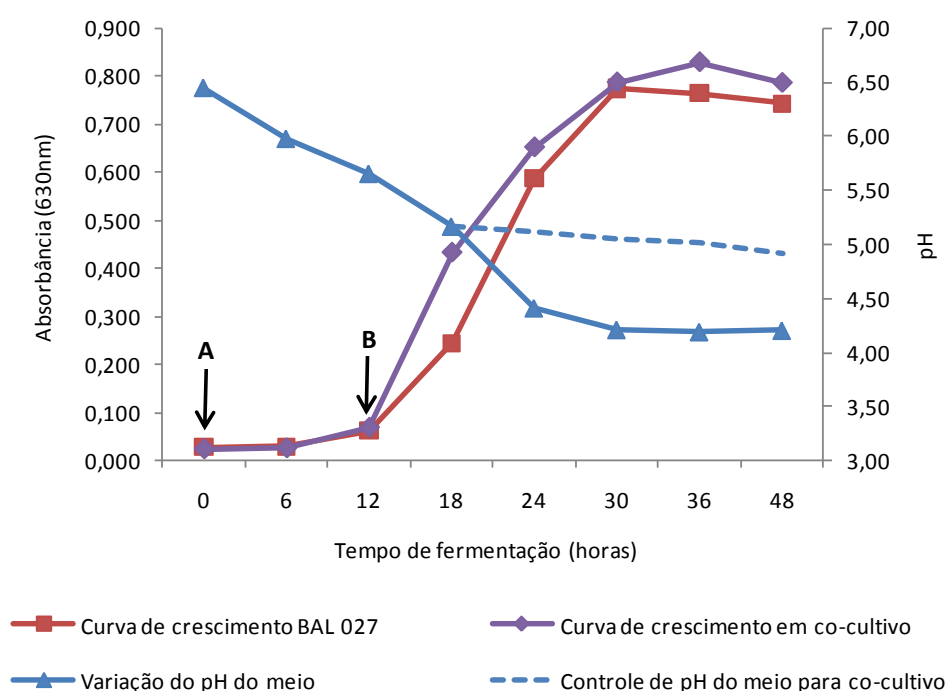
Os resultados deste estudo condizem com o sucesso que outros autores têm observado quando se utilizam da técnica de co-cultivo na indução de compostos antimicrobianos por BAL e, em particular, fazendo uso de *Staphylococcus aureus* como cultura indutora (TABBENE *et al.*, 2011). Esta estratégia de fermentação aplicada à produção de biomoléculas preliminarmente caracterizadas como bacteriocinas tem sido relatada como eficiente para uma ação estimuladora, assim, importantes acréscimos de produção podem ser registrados, como observado por Todorov *et al.* (2007), que obtiveram uma produção de bacteriocina duas vezes maior pela fermentação em cultura mista de *Lactobacillus plantarum* na presença de *Listeria innocua* em relação à fermentação simples, apenas por *L. plantarum*, e justificam que a presença do microrganismo-alvo no meio fermentativo causa estímulo através da ativação das proteínas receptoras localizadas na parede celular da cultura produtora.

Maldonado *et al.* (2003) induziram com sucesso a produção de bacteriocina por *L. plantarum* na presença de outra bactéria láctica (*L. lactis*), sendo esta produção induzida ligada a um estímulo externo (co-cultivo) e mediada pela ativação do mecanismo de *quorum-sensing*, responsável pela expressão de genes estruturais envolvidos nesta síntese. Ruiz-Barba *et al.* (2010) conseguiram induzir a produção de bacteriocina a partir da mesma cepa de *L. plantarum* estudada por Maldonado *et al.* (2003) em co-cultivo com *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus*. Os autores enfatizam que o contato célula-célula, entre a cepa produtora e a indutora, foi essencial para a produção do antimicrobiano.

4.3.2 Cinética de crescimento celular

A curva de crescimento bacteriano foi determinada para a BAL 027, tanto em cultivo simples quanto em co-cultivo com *S. aureus* ATCC 25923, através do monitoramento da densidade celular pela absorbância, e paralelamente foi realizado o acompanhamento do pH do meio de cultivo, conforme os parâmetros cinéticos apresentados na Figura 06.

Figura 6 - Cinética de fermentação da BAL 027 em cultivo simples e em co-cultivo em caldo MRS.



Legenda: **(A)** Inóculo da BAL 027 em tempo zero; **(B)** Inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em 12 horas de cultivo (apenas para curva de co-cultivo).

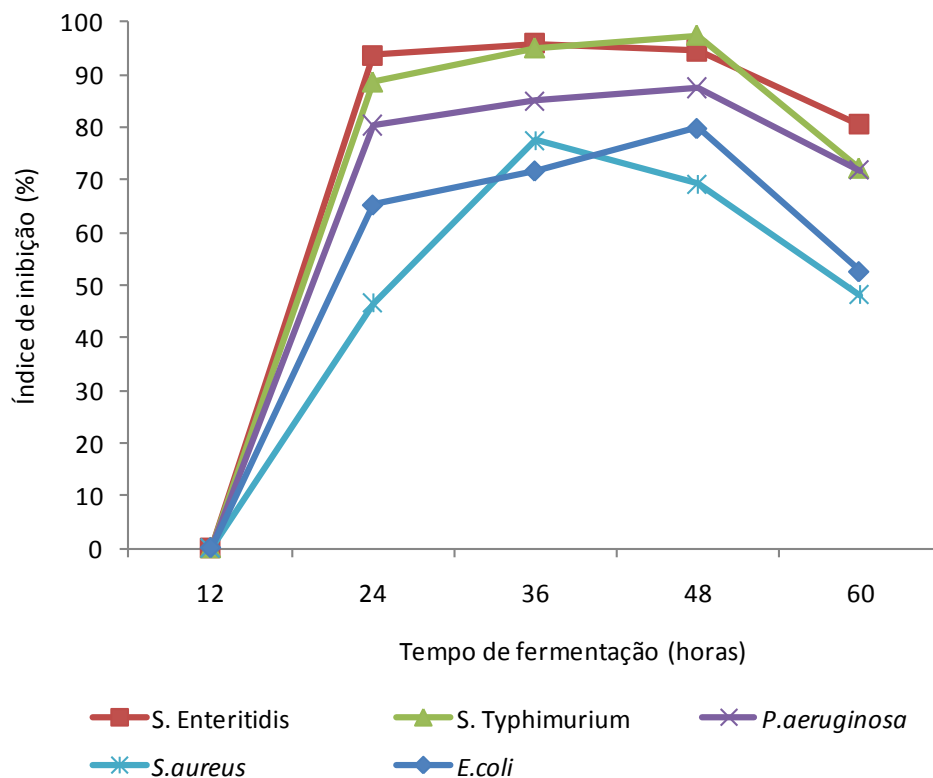
O período de adaptação da cultura láctica ao meio de cultura parece corresponder as primeiras 12 horas após o inóculo, assim este período ficou reconhecido como fase *lag*. A partir deste ponto, a multiplicação torna-se exponencial até aproximadamente 30 horas de fermentação. No início da fase exponencial é inserida a cultura indutora para as fermentações em co-cultivo, dessa maneira, ambas as culturas se desenvolvem simultaneamente. Nota-se nesta condição uma maior densidade celular em relação ao cultivo simples, por exemplo, com 18 horas de fermentação. Supõe-se que este maior contato célula-célula promovido durante a fase de crescimento exponencial tenha tido influência como fator de indução para a síntese de compostos antimicrobianos. A concentração celular torna-se similar entre as duas condições de fermentação com 30 horas e, a partir deste momento, segue uma tendência de desaceleração do crescimento, seguida da fase estacionária de crescimento (36 – 48 horas).

A produção de ácidos orgânicos na fermentação láctica é intensa e por isso causa rapidamente acidificação do meio de cultivo. Pela linha contínua de determinação do pH percebe-se que após 18 horas de fermentação este parâmetro já encontra-se próximo a 5,0, seguindo uma tendência de queda acentuada até valores entre 4,1 e 4,2, ao final do processo fermentativo. Este comportamento reflete o metabolismo habitual da BAL 027. Na condição de co-cultivo, a viabilidade da cepa indutora precisa ser mantida junto ao metabolismo da BAL 027, porém a capacidade de sobrevivência de *S. aureus* em condições acidificadas é reconhecida até pH em torno de 4,5 e a viabilidade celular é favorecida em ambientes menos ácidos, a partir de pH 5,0 – 5,5 (VALERO *et al.*, 2009; WHITING *et al.*, 1996). Por esta razão, nos processos fermentativos em co-cultivo foram requeridos ajustes de pH no meio de fermentação, mantendo-o sempre próximo a 5,0. Tais ajustes foram realizados sempre no momento de tomada das amostras, a partir de 18 horas de fermentação, conforme representado pela linha pontilhada da Figura 08.

4.3.3 Cinética de produção de compostos antimicrobianos

A produção de compostos antimicrobianos foi avaliada em alíquotas tomadas a cada 12 horas do processo e os resultados estão expressos como índice de inibição (%) em função do tempo de fermentação, para cada bactéria indicadora, conforme ilustrado na Figura 07.

Figura 7 - Cinética de produção de compostos antimicrobianos pela BAL 27 em co-cultivo com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



As alíquotas tomadas nos diferentes tempos de cultivo geraram extratos brutos com índices de inibição distintos para cada bactéria indicadora, porém a concentração dos compostos antimicrobianos, e por consequência, o comportamento da ação inibitória, foi similar entre as cinco bactérias, em função do tempo de fermentação. Os processos fermentativos que geraram os extratos brutos avaliados até então foram provenientes de fermentações de 24 horas, entretanto se observou que a concentração dos compostos antimicrobianos aumentou quando o processo foi conduzido até 36 horas, e para a maioria das bactérias indicadoras (*E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*) foi ainda superior nas alíquotas de 48 horas de fermentação. Os níveis de compostos antimicrobianos decresceram quando o processo se estendeu até 60 horas de fermentação para todas as avaliações.

Considerando a curva de crescimento da BAL 027 em co-cultivo, entende-se que a concentração de compostos ativos foi máxima ao final da fase exponencial e

início da fase estacionária de crescimento (36 ~ 48 horas). Resultados similares foram observados por Todorov (2008) que obteve pico de produção da bacteriocina AMA-K após 29 horas de fermentação de *Lactobacillus plantarum*, período correspondente ao final da fase exponencial de crescimento da bactéria. Por esse motivo, o autor considerou este um metabólito primário (TODOROV, 2008).

4.3.4 Perfil de ação antimicrobiana

Durante o ensaio de atividade antimicrobiana por microdiluição foi possível acompanhar o crescimento de cada bactéria indicadora na presença dos compostos inibitórios em avaliação, gerando assim um perfil de ação antimicrobiana em tempos regulares de leitura dos dados. O perfil de ação do extrato bruto da BAL 27, fermentada em co-cultivo com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, está apresentado através das Figuras 08, 09, 10, 11 e 12. Nos ensaios há um controle de crescimento da bactéria indicadora que não recebeu o tratamento com o extrato bruto avaliado, permitindo assim verificar a influência dos compostos inibitórios sobre o seu desenvolvimento.

Figura 8 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre *Escherichia coli*.

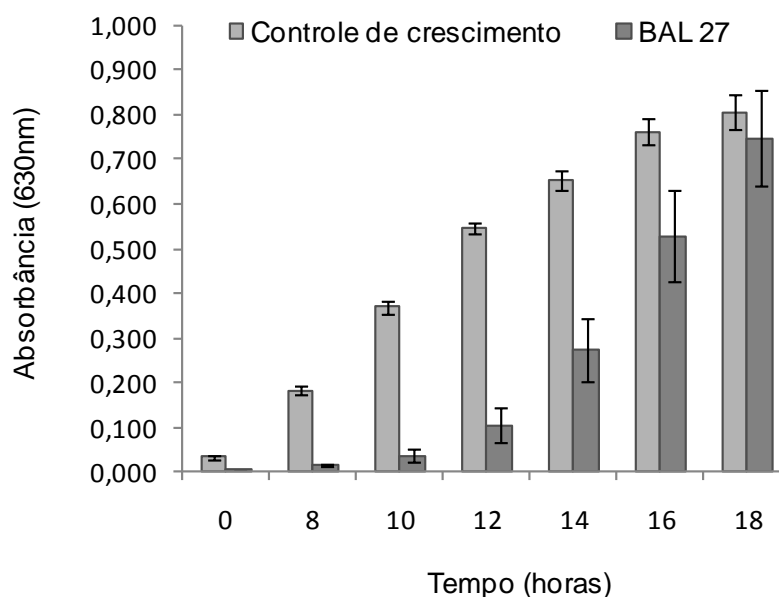


Figura 9 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre *Salmonella* Enteritidis.

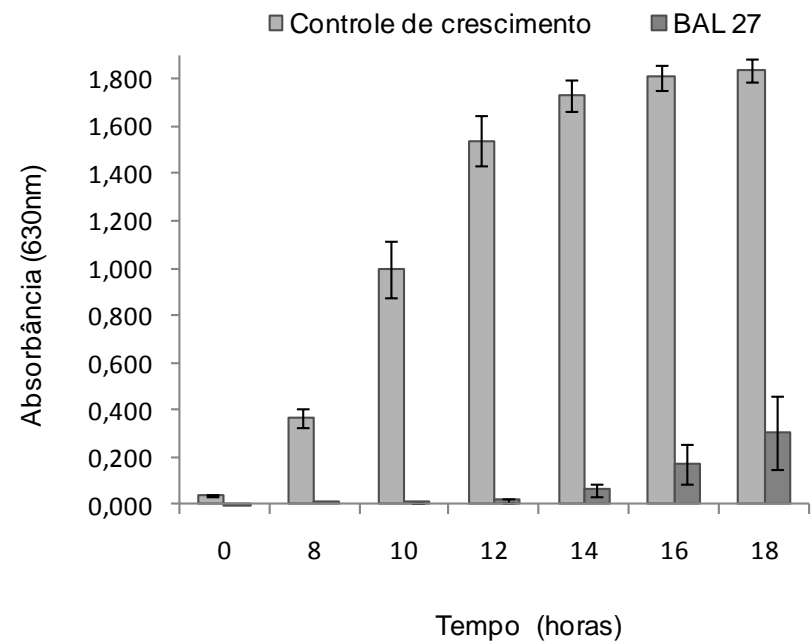


Figura 10 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre *Salmonella* Typhimurium.

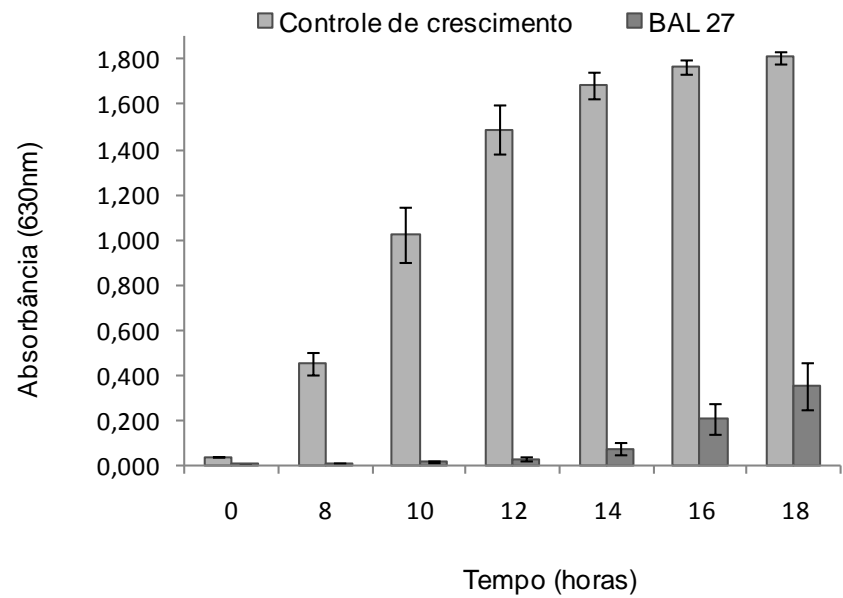


Figura 11 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

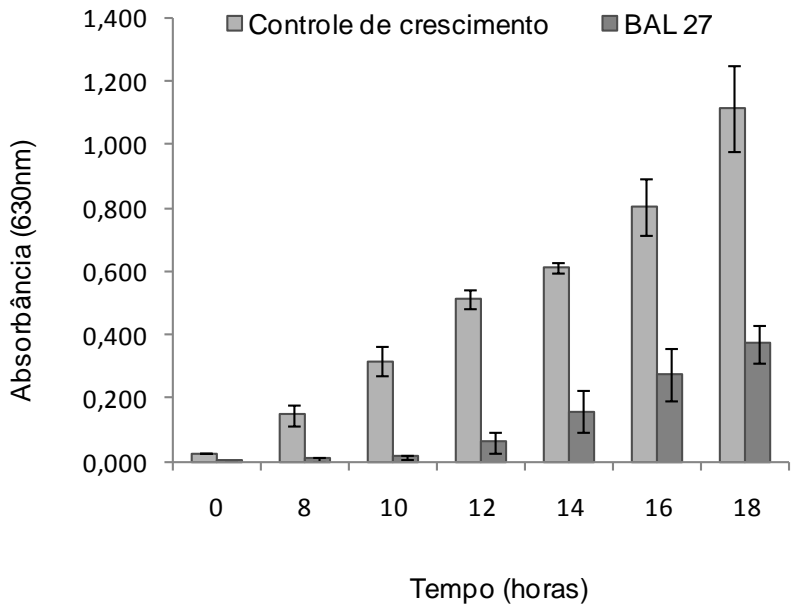
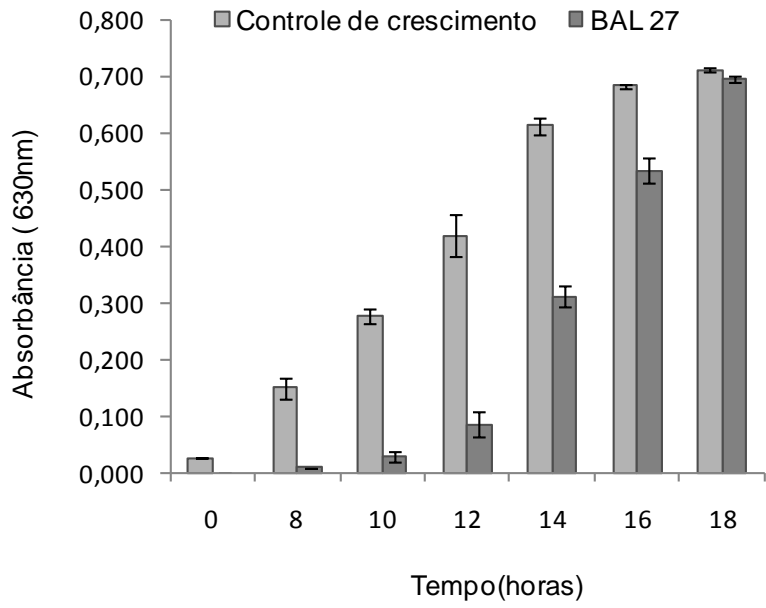


Figura 12 - Perfil de ação antimicrobiana do extrato bruto da BAL 027 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Os dados do perfil de ação antimicrobiana sugerem uma atuação bacteriostática promovida pelos compostos ativos presentes no extrato bruto da BAL 27, assim interpretada por agir de maneira retardatária ao desenvolvimento, mantendo taxas menores de multiplicação, porém sem causar a completa mortalidade da população. Esta última característica se deve a uma ação bactericida, que tem modo de ação diferenciado da bacteriostática. Basicamente, as substâncias bacteriostáticas agem sobre rotas metabólicas essenciais para o crescimento microbiano, mas não necessariamente para sua sobrevivência. Esta ação é especialmente observada pela inibição da síntese de proteínas ou pelo bloqueio da replicação e transcrição do DNA, impedindo o aumento no número de indivíduos. Por outro lado, a ação bactericida age normalmente sobre a parede celular ou membrana citoplasmática bacteriana, impedindo sua síntese ou provocando lise celular, causa imediata da morte bacteriana (GOLAN *et al.*, 2008).

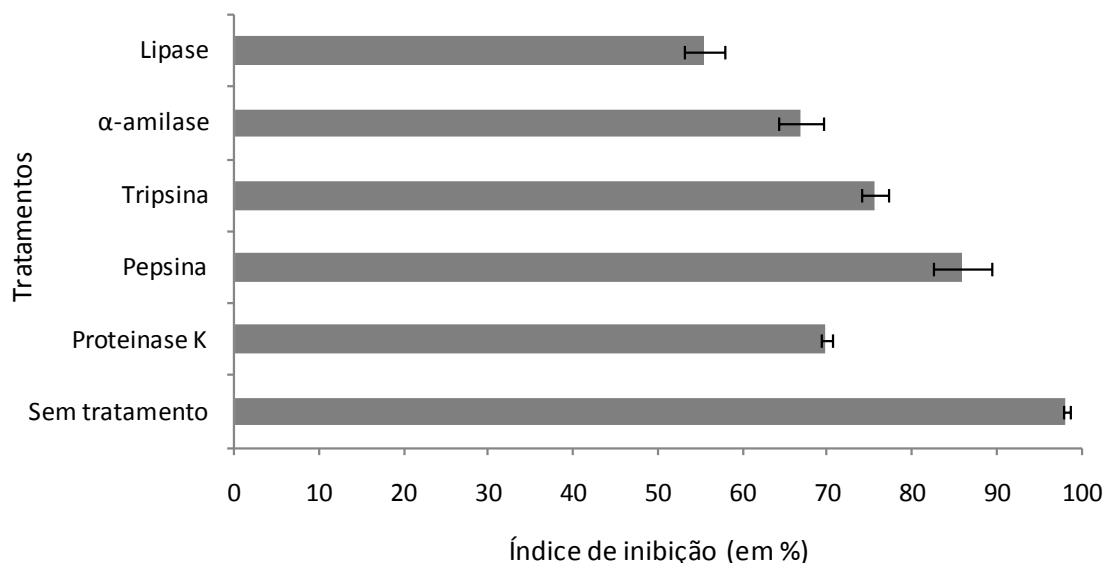
Este julgamento tem como base o extrato bruto proveniente da fermentação e que naturalmente é composto por inúmeros subprodutos deste metabolismo, que podem atuar como interferentes à ação antimicrobiana. Além disso, a baixa concentração dos compostos ativos no extrato pode ser um fator limitante para uma ação inibitória mais efetiva.

4.4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BIOMOLÉCULA

4.4.1 Caracterização da natureza dos compostos ativos

O emprego de soluções enzimáticas habitualmente tem sido utilizado como ferramenta na caracterização da natureza dos compostos antimicrobianos provindos de bactérias lácticas, pois pode fornecer noções sobre a estrutura da molécula (ABRAMS *et al.*, 2011; TODOROV *et al.*, 2010; PASCUAL *et al.*, 2008; GULAHMADOV *et al.*, 2006; KWAADSTENIET *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana residual após os tratamentos enzimáticos, em comparação a atividade inicial de uma amostra-controle, permite identificar a sensibilidade dos compostos ativos em relação a cada ação enzimática específica. Desta maneira um estudo para caracterizar a natureza dos compostos ativos presente no extrato bruto da BAL 027 foi realizado e os resultados estão apresentados através da Figura 13.

Figura 13 - Atividade antimicrobiana residual após tratamento enzimático.



A atividade antimicrobiana inicial de 98% (alíquota sem tratamento) sobre *Salmonella* Typhimurium, em fase exponencial de crescimento, foi parcialmente reduzida em todos os tratamentos enzimáticos avaliados. Para o grupo das enzimas proteolíticas, a perda mais significativa foi devido ao tratamento com proteinase K (atividade residual de 70%), em seguida por tripsina (atividade residual de 76%), e o tratamento com pepsina foi o menos danoso à atividade antimicrobiana, que permaneceu com 86% de inibição após o contato enzimático. A ação das enzimas não-proteolíticas também resultou em significativas perdas de atividade antimicrobiana após os tratamentos, tanto com α -amilase quanto com lipase. Na primeira, o índice de inibição residual foi de 67%, enquanto para lipase, este índice ficou em 55% e representou o maior decréscimo entre todos os tratamentos avaliados.

Resultados semelhantes são relatados por outros pesquisadores, como descritos a seguir:

- Completa inativação ou redução significativa da atividade antimicrobiana foram observadas após tratamento enzimático com proteinase K, pronase, pepsina e tripsina. Ao contrário, tratamento com α -amilase não alterou a atividade inibitória de bacAMA-K, produto sintetizado por *Lactobacillus plantarum* AMA-K (TODOROV *et al.*, 2007);

- Tratamento enzimático com α -amilase provocou completa inativação das substâncias antimicrobianas ativas produzidas por três cepas de *Lactobacillus paracasei*, porém no mesmo ensaio, o tratamento não foi prejudicial à atividade antimicrobiana das substâncias ativas sintetizadas a partir de uma cepa de *L. rhamnosus*. Todas as quatro amostras foram parcialmente sensíveis à ação de lipase, e integralmente sensíveis a pronase E e proteinase K (GULAHMADOV *et al.*, 2006);
- Sensibilidade à α -amilase também foi observada para compostos inibidores produzidos por 5 BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Da mesma forma, todos foram sensíveis à ação de proteinase K e tripsina, mas nenhuma perda de atividade foi registrada após tratamento com pepsina. A enzima lipase não foi avaliada neste experimento (DE MARTINIS *et al.*, 2003);
- Compostos ativos de *L. acidophilus* e *Pediococcus acidilactici* foram completamente comprometidos pela desnaturação causada por protease e α -amilase, enquanto não sofreram qualquer perda em função do tratamento com lipase (SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Os resultados de sensibilidade à ação enzimática obtidos neste estudo sugerem que a atividade antimicrobiana provenha essencialmente de compostos com caráter protéico, comprovado pela múltipla sensibilidade aos tratamentos proteolíticos. Entretanto, a atividade biológica parece estar relacionada intimamente com outras frações lipídicas e glicídicas, que se mostraram importantes para a manutenção da atividade antimicrobiana.

Esta caracterização permite supor que os compostos responsáveis pela ação inibitória a partir da BAL 027 sejam bacteriocinas ou substâncias bastante similares, habitualmente referidas pela terminologia “*bacteriocin-like*”. Este termo vem sendo recentemente utilizado e se refere àqueles compostos produzidos por BAL que apresentam atividade inibitória incompletamente definida ou que não completam todos os critérios típicos que definem a classe das bacteriocinas. Além disso, estes compostos tendem a apresentar um amplo espectro de atividade antimicrobiana (BORIS & BARBÉS, 2000).

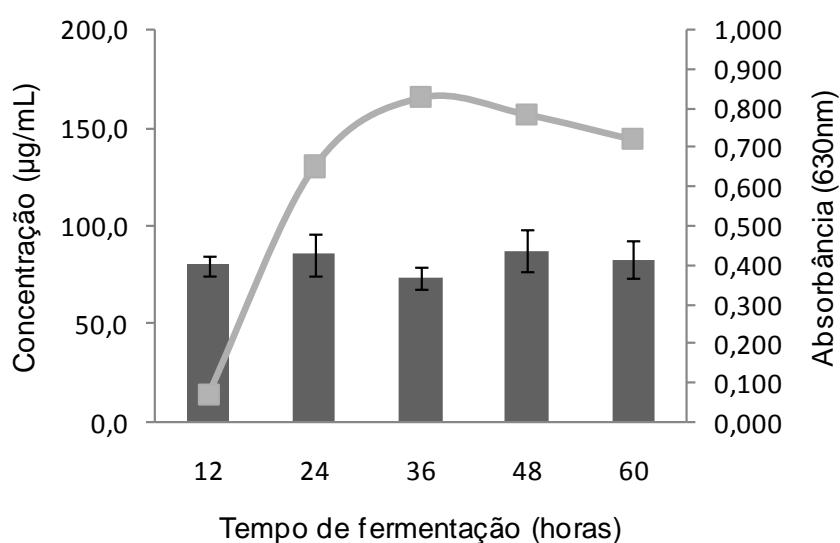
A biomolécula do presente estudo assemelha-se mais às bacteriocinas da classe IV, segundo a classificação por Allison & Klaenhammer (1999), devido a sua provável estrutura química possuir junto à porção protéica principal, cadeias

glicosiladas e compostos lipoprotéicos agregados, fato evidenciado pela perda de atividade biológica pelos tratamentos enzimáticos não-proteolíticos. Este perfil de sensibilidade e estrutura química não é observado nas bacteriocinas das classes I, II e III. O conhecimento acerca da classe IV de bacteriocinas é bastante limitado e controverso, porque representa o grupo menos estudado até então. Apenas uma pequena porção de bacteriocinas compartilha tais características e poderia ser denominadas como pertencentes a esta classe, porém esta classificação geralmente não fica explícita. Outros exemplos de bacteriocinas com tais características são: leuconocina S (LEWUS *et al.*, 1992), carnocina 54 (KEPPLER *et al.*, 1994), bacteriocina N15 produzida por *Enterococcus faecium* N15 (LOSTEINKIT *et al.*, 2001), enterocina DB1 (LEE & KIM, 2010).

4.4.2 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas totais do extrato bruto foi quantificado a partir de alíquotas durante o processo fermentativo de produção de compostos antimicrobianos pela BAL 027 sob co-cultivo, e está apresentada através da Figura 14.

Figura 14 - Perfil protéico de alíquotas de extrato bruto durante a fermentação.



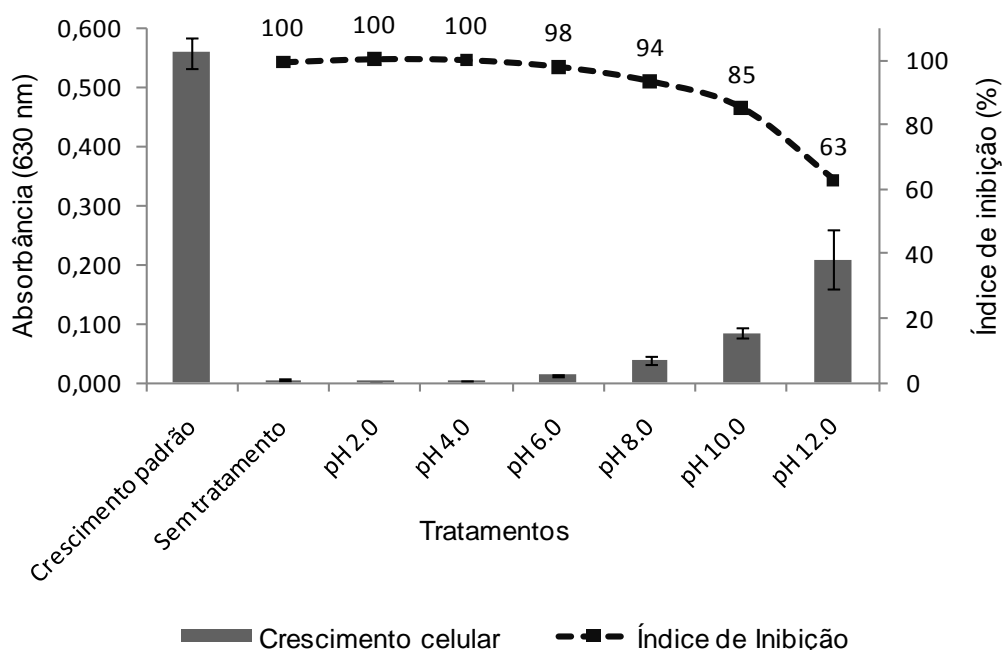
Legenda: **barras verticais** representam a quantificação de proteínas totais no extrato bruto; **linha contínua** representa a densidade celular medida pela absorbância durante o processo fermentativo.

O objetivo deste acompanhamento foi avaliar um possível pico na concentração de proteínas, que por sua vez poderia representar um elevado índice de atividade antimicrobiana. Entretanto, tal medida representa uma estimativa indireta e quantifica todas as proteínas presentes no caldo de fermentação, somando várias proteínas interferentes e sem atividade. Os resultados observados foram concentrações similares de proteínas totais, em todas as fases do crescimento microbiano. Nesta situação, não foi possível utilizar este critério como estimativa de produção de compostos antimicrobianos. A média foi de 81,9 μg de proteínas totais por mililitro (mL) de extrato, e a maior concentração foi em 48 horas, com 87,5 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos compostos antimicrobianos

A estabilidade dos compostos ativos foi estudada pelo tratamento de alíquotas do extrato bruto sob condições controladas de pH e temperatura. Observando a atividade remanescente pós-tratamentos foi possível caracterizar a estabilidade destes compostos. Os resultados de estabilidade às condições controladas de pH podem ser visualizados através da Figura 15.

Figura 15 - Perfil de estabilidade do extrato bruto da BAL 027 sob diferentes condições de pH.



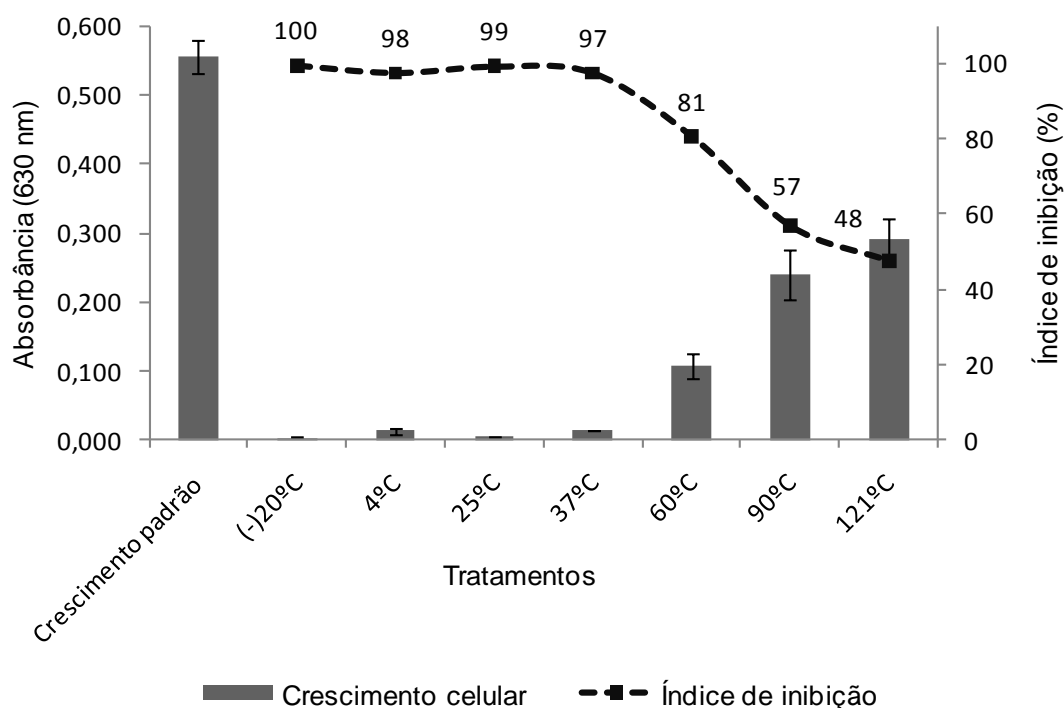
Observando os valores de índice de inibição na Figura 15 é possível afirmar que os compostos ativos mantiveram-se estáveis sob condição ácida até pH 2,0, e demonstraram sensibilidade crescente quando submetidos ao pH alcalino, com declínio de atividade a partir de pH 8,0 e perda máxima em pH 12,0, com apenas 63% de atividade inibitória residual.

A perda de atividade em meio alcalino representa uma característica em comum das bacteriocinas, que habitualmente possuem caráter acidófilo e são rapidamente desnaturadas sob condições alcalinas. Abrams *et al.* (2011) observaram resultados similares ao avaliar a estabilidade de uma bacteriocina produzida por *Pediococcus pentosaceus*, que demonstrou comportamentos distintos sobre a atividade antimicrobiana entre dois microrganismos-alvo. Em suma, o percentual inibitório residual ficou entre 0 e 78% sob pH 8,0, 0 e 67% sob pH 10,0, e 0 e 44% sob pH 12,0; em pH ácido manteve-se próximo a 100%, sendo o menor índice registrado de 78% em pH 2,0 (ABRAMS *et al.*, 2011). Nos estudos de Gulahmadv *et al.* (2006), a atividade de bacteriocina foi parcialmente comprometida sob pH 2,0 e completamente perdida em pH 12,0, em avaliação qualitativa de atividade (através da presença ou ausência de halo de inibição em ágar).

A tolerância e estabilidade ao pH ácido é bastante apreciada como característica da biomolécula quando se planeja um futuro emprego industrial, como por exemplo como suplemento alimentar ou agente de tratamento antibacteriano para saúde animal. Considerando a possível ingestão oral destes compostos, é necessário que a atividade seja conservada sob as adversas condições do trato gastrointestinal animal. Normalmente o pH estomacal está em torno de 0,9, entretanto na presença de alimentos esse pH fica próximo a 3,0 (PANCHENIAK, 2005). Nestas condições provavelmente não haveria perda de atividade antimicrobiana pelos compostos estudados, conforme os resultados observados na Tabela 15.

Outro importante agente desnaturante em potencial para estruturas protéicas é a temperatura. Os compostos antimicrobianos da BAL 027 também foram avaliados quanto à estabilidade frente a diferentes condições de temperatura e os resultados são apresentados através da Figura 16.

Figura 16 - Perfil de estabilidade do extrato bruto da BAL 027 sob diferentes condições de temperatura.



Os compostos inibitórios da BAL 027 demonstram-se parcialmente sensíveis a ação da temperatura, especialmente a partir de 60°C, com tendência ao decréscimo da atividade em função de maiores temperaturas de aquecimento. Por outro lado, nenhum dos tratamentos destruiu completamente a atividade biológica, conferindo uma característica importante de estabilidade à estrutura protéica. As avaliações sob temperatura de refrigeração mantiveram satisfatoriamente o potencial inibitório, seja durante 30 dias a -20°C, ou 15 dias a 4°C. Diferentes autores reportam resultados similares, como aqueles divulgados por Abrams *et al.* (2011) que estudaram uma bacteriocina estável sob temperaturas de congelamento, refrigeração e até 37°C, e parcialmente sensível a temperaturas de aquecimento, com avaliações a 60°C (89% de inibição), 80°C (94% de inibição), 99°C (78% de inibição) e 121°C (72% de inibição). Gulahmadv *et al.* (2006) também reporta perda de atividade antimicrobiana a 100°C e 121°C. Já outros autores trabalharam com bacteriocinas ou compostos similares termoestáveis, ou seja, sem quaisquer perda de atividade antimicrobiana após os tratamentos térmicos (LEE *et al.*, 2010; TODOROV *et al.*, 2010; PASCUAL *et al.*, 2008; TODOROV *et al.*, 1999).

4.4.4 Estimativa de tamanho molecular por ultrafiltração

O procedimento de ultrafiltração em membranas de celulose permitiu fracionar as proteínas do extrato bruto de acordo com o seu tamanho molecular. As frações foram avaliadas quanto ao índice de inibição remanescente, em percentual, sobre o crescimento da bactéria indicadora *Salmonella* Typhimurium, além do monitoramento da concentração de proteínas totais e volume residual. Os dados são apresentados através da Tabela 20.

Tabela 20 - Avaliações de extrato bruto e alíquotas obtidas por ultrafiltração.

Frações avaliadas	Índice de inibição sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium	Teor de proteínas totais (µg/mL)	Volume retido (mL)	Fator de atividade específica relativa*
1) Extrato bruto total	83%	71,4	10,0	1,1
2) Extrato > 50 kDa	82%	199,0	1,6	0,4
3) Extrato 30-50 kDa	64%	44,8	0,4	1,4
4) Extrato 10-30 kDa	68%	69,5	1,8	0,9
5) Extrato 3-10 kDa	67%	10,5	4,1	6,4
6) Extrato < 3 kDa	57%	6,7	2,1	8,5

*Fator de atividade específica relativa = índice de inibição / teor de proteínas total

Todas as frações resultantes das etapas de ultrafiltração apresentaram algum potencial de inibição, sempre superior a 50%. Observando o teor de proteínas totais em cada extrato, fica evidente a alta concentração de proteínas de grande tamanho molecular (~ >50 kDa) na alíquota n. 2. Nas frações subseqüentes (n. 3 e 4), a concentração de proteínas diminuiu em relação à anterior em função da maior seletividade por tamanho molecular. As frações n. 5 e 6 tem concentração protéica reduzida (10,5 e 6,7 µg/mL, respectivamente), entretanto, preservam índices de inibição importantes (67% e 57%). Tais resultados permitem uma interpretação acerca da alta especificidade destas proteínas contidas nas frações n. 5 e 6, em relação a atividade antimicrobiana. Da mesma forma, tal relação pode ser aplicada para a fração n. 2, que em termos de concentração protéica teve incremento de aproximadamente 280% e, em contrapartida, o índice de inibição não cresceu na mesma proporção, mas manteve-se praticamente estável em relação ao índice

original, ou seja, a função antimicrobiana não é dependente das proteínas contidas nesta fração.

Na última coluna da Tabela 20 está disposto o fator de atividade específica, que relaciona o potencial antimicrobiano em função da concentração protéica para cada fração e no extrato bruto. O fator de atividade específica inicial (correspondente ao extrato bruto) era 1,1 e passou a 8,5 na fração composta pelas pequenas proteínas com tamanho molecular inferior a 3 kDa. Houve um incremento superior a 650% em relação à atividade específica. Na fração anterior (entre 3 e 10 kDa), o ganho foi de aproximadamente 500%, e nos demais houve pouco ou nenhum incremento de atividade específica.

Estes resultados sugerem que a biomolécula ativa, responsável pela função antimicrobiana no extrato de fermentação pela BAL 027, estaria mais concentrada nas porções de menor tamanho molecular e se caracterizando, portanto, como um peptídeo com ação antimicrobiana. Há grandes possibilidades de que tal estrutura se apresente com tamanho molecular inferior a 3 kDa, razão pela qual estaria sendo registrada atividade inibitória na menor fração (<3 kDa), propiciada pela permeabilidade deste pela malha de ultrafiltração. Entretanto, também é possível que o tamanho molecular do peptídeo esteja em uma faixa muito próxima àquela da membrana de corte, fato que também possibilita a passagem através dos poros. A distribuição do tamanho dos poros nem sempre é uniforme neste tipo de membrana, e ainda, a passagem de moléculas lineares pode ser facilitada em relação a moléculas globulares, e isto reduziria o “*cut-off*” do sistema. O “*cut-off*” fica melhor definido como o diâmetro nominal de corte, e representa a massa molecular mínima necessária para reter uma molécula globular (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A presença de atividade inibitória em todas as frações, inclusive naquelas onde se concentram as proteínas de maior tamanho molecular e que parece não possuir função ativa, poderia ser justificada pela retenção de pequenas quantidades de peptídeos entre as etapas de separação. O sistema de ultrafiltração realizado em nível de bancada nem sempre é capaz de separar completamente as proteínas presentes no extrato bruto, segundo dados do próprio fabricante das membranas de celulose (Millipore®). Há um percentual máximo de recuperação para cada membrana, sob condições ótimas de ensaio, sendo que, por exemplo, para a membrana de corte de 10 kDa, este percentual chega até 93,03% (MILLIPORE, 2011). Outra situação capaz de permitir que haja atividade residual em todas as

alíquotas é a impossibilidade de permeação dos pequenos peptídeos devido à aglomeração de moléculas maiores sob a área superficial da membrana. Esta atividade residual, potencializada por estar contida em pequenos volumes, é que seria a responsável pela inibição do crescimento da bactéria indicadora nas alíquotas n. 2, 3 e 4.

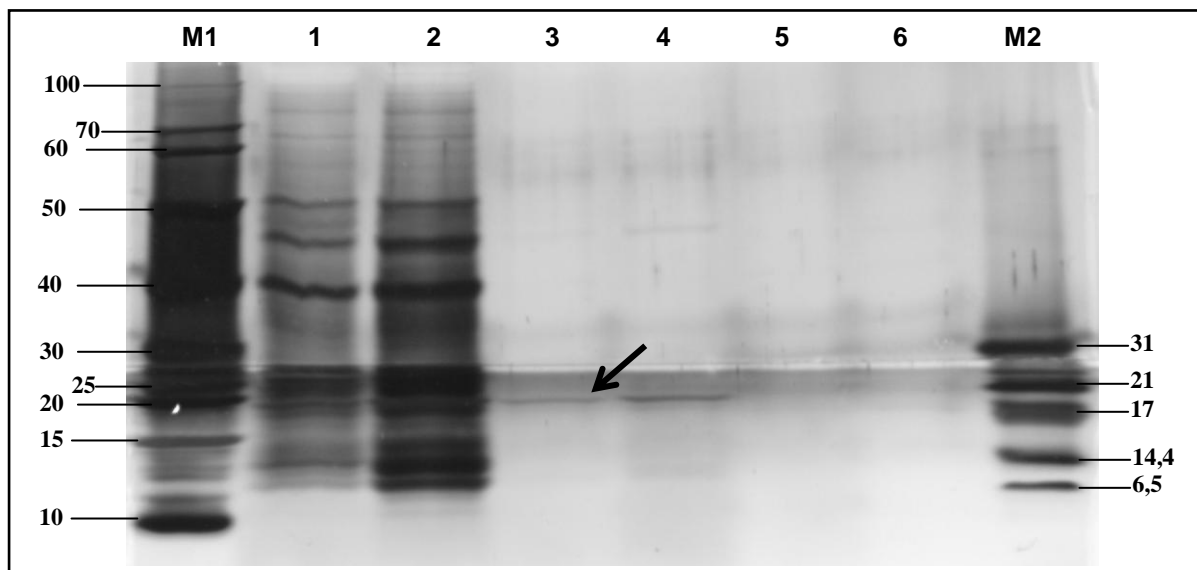
Alguns autores têm estudado biomoléculas de origem protéica, com ação antimicrobiana e proveniente de bactérias lácticas que possuem tamanho molecular aproximado, como por exemplo: uma bacteriocina produzida por *Enterococcus mundtii* com 3,9 kDa (KWAADSTENIET *et al.*, 2005); enterocina CRL35 com 4,3 kDa (PINGITORE *et al.*, 2007); bacteriocina ST5Ha com 5,0 kDa (TODOROV *et al.*, 2010).

Como avaliação geral do procedimento de ultrafiltração, entende-se que o fracionamento não foi eficiente para definir exatamente em qual das frações encontra-se a substância ativa, em contrapartida, os resultados indicam um estreitamento maior entre a atividade antimicrobiana e proteínas de pequeno tamanho molecular.

4.4.5 Eletroforese de proteínas

O perfil protéico do extrato bruto e das alíquotas provenientes das etapas de ultrafiltração foi caracterizado por eletroforese Tricina-SDS-PAGE. O emprego do sistema de eletroforese baseado nos tampões compostos de Tricina-Tris se deu após a constatação de baixa resolução para géis de acrilamida quando submetidos à corrida eletroforética com tampão de Glicina-Tris, utilizado no método tradicional de Laemmli. O sistema Tricina-SDS-PAGE é recomendado à visualização de bandas de proteínas de pequeno tamanho molecular, ou seja, menor que 30 kDa, e, por outro lado, o sistema Glicina-SDS-PAGE é apropriado para a visualização das bandas de proteínas de tamanho molecular superior a 30 kDa (SCHÄGGER, 2006). Dessa maneira, procedeu-se a eletroforese e na Figura 17 é possível observar as bandas obtidas após a coloração com prata amoniacal.

Figura 17 - Eletroforese Tricina-SDS-PAGE de extrato bruto e extratos ultrafiltrados.



Legenda: (M1) Marcador de peso molecular em kDa (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas®); (1) Extrato bruto total; (2) Extrato > 50 kDa; (3) Extrato 30-50 kDa; (4) Extrato 10-30 kDa; (5) Extrato 3-10 kDa; (6) Extrato < 3 kDa; (M2) Marcador de baixo peso molecular em kDa (K880 AMRESCO®).

Houve uma grande quantidade de bandas de proteínas visíveis na coluna 1, correspondente a amostra do extrato bruto, já que esta representa a totalidade de proteínas provenientes da fermentação pela BAL 027. Com o mesmo perfil de bandas, porém com maior intensidade, foram as bandas presentes na coluna 2, que compreende essencialmente todas as proteínas retidas na malha de 50 kDa, após procedimento de ultrafiltração. A concentração das proteínas se deu pela retenção destas em apenas 16,6% do volume inicial, já que outros 83,4% do volume permearam pela membrana de corte (dados apresentados na Tabela 20). Quando comparados aos padrões do marcador de peso molecular M1, nota-se, ainda na coluna 2, a presença de bandas abaixo da linha de correspondência a 50 kDa. Isso se deve, muito provavelmente, a retenção de proteínas menores em virtude da obstrução da malha por moléculas maiores, ou ainda porque tais proteínas possivelmente estariam conjugadas a outras porções glicídicas, lipídicas ou em agregados protéicos em seu estado nativo, que aumentariam o peso molecular da substância e impediriam sua passagem pela membrana nestas condições. Como um procedimento de desnaturação por fervura é aplicado nas amostras antes da corrida eletroforética, tais grupamentos seriam desfeitos, gerando fragmentos menores e,

com isso, a possibilidade de serem visualizados através destas bandas. Na coluna 3, onde está disposta a alíquota correspondente a fração permeada em membrana de 50 kDa e retida na malha de 30 kDa, é possível detectar apenas uma banda com baixa intensidade, localizada entre 20 e 25 kDa (sinalizada pela seta). Ao mesmo tempo, nesta fração é possível confirmar que as grandes proteínas ficaram retidas na membrana de corte de 50 kDa. Em seguida, na fração correspondente às proteínas com peso molecular entre 10 e 30 kDa (coluna 4) ficou visível apenas a mesma banda já observada na coluna 3, com maior intensidade neste última fração. Nas duas últimas colunas (5 e 6), que representam as alíquotas compostas pelos peptídeos com os menores tamanhos moleculares, entre 10 e 3 kDa e inferior a 3 kDa, respectivamente, nenhuma banda ficou visível para o sistema de coloração com prata amoniacal aplicado. Apesar disto, constatou-se atividade antimicrobiana nestas frações, conforme apresentado na Tabela 20. Dessa maneira, supõe-se que devido às baixas concentrações de proteínas observadas nas alíquotas não foi possível sua visualização.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS

O conhecimento da identidade das linhagens de estudo representa um importante passo para caracterizar o processo e os produtos. Neste estudo, todas as linhagens de BAL selecionadas na triagem correspondiam a cepas selvagens isoladas de diferentes origens, como descrito na Tabela 21. A opção de identificação utilizando técnicas moleculares justifica-se porque os métodos fenotípicos aplicados à BAL habitualmente são insuficientes na diferenciação das espécies, que requerem a determinação de propriedades bacterianas acima daquelas disponíveis por testes fermentativos comuns, como fermentação de glicose e outros carboidratos (MOHANIA *et al.*, 2008).

A classificação taxonômica das BAL pode ser realizada então através da caracterização genotípica. O emprego do par de iniciadores 27F e 1492R (LANE *et al.*, 1991) permite a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1.500 pares de bases do gene 16S rDNA, que serve como molde para a síntese do 16S rRNA. O 16S rRNA é uma das moléculas que compõe com outras 21 proteínas, a subunidade menor do ribossomo nos domínios Bacteria e Archea. A sequência de

16S rDNA se tornou referência na determinação da relação filogenética em bactérias por apresentar características necessárias a um marcador molecular adequado pois apresenta distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os táxons e um tamanho suficiente para a ocorrência de divergências na sequência, fato que permite um amplo campo de investigações filogenéticas, desde o nível de domínio até o nível de espécie (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994).

Tabela 21 - Origem dos isolados de BAL selecionadas.

Identificação da linhagem	Origem de isolamento*
BAL 024	Intestino de peixe
BAL 027	Fezes de frango caipira
BAL 037	Frutos de coco
BAL 038	Frutos de coco
BAL 040	Frutos de coco
BAL 043	Fezes de bebê
BAL 061	Embutido de carne tipo salame
BAL 095	Embutido de carne tipo salame
BAL 129	Grãos de café
BAL 224	Fezes de papagaio

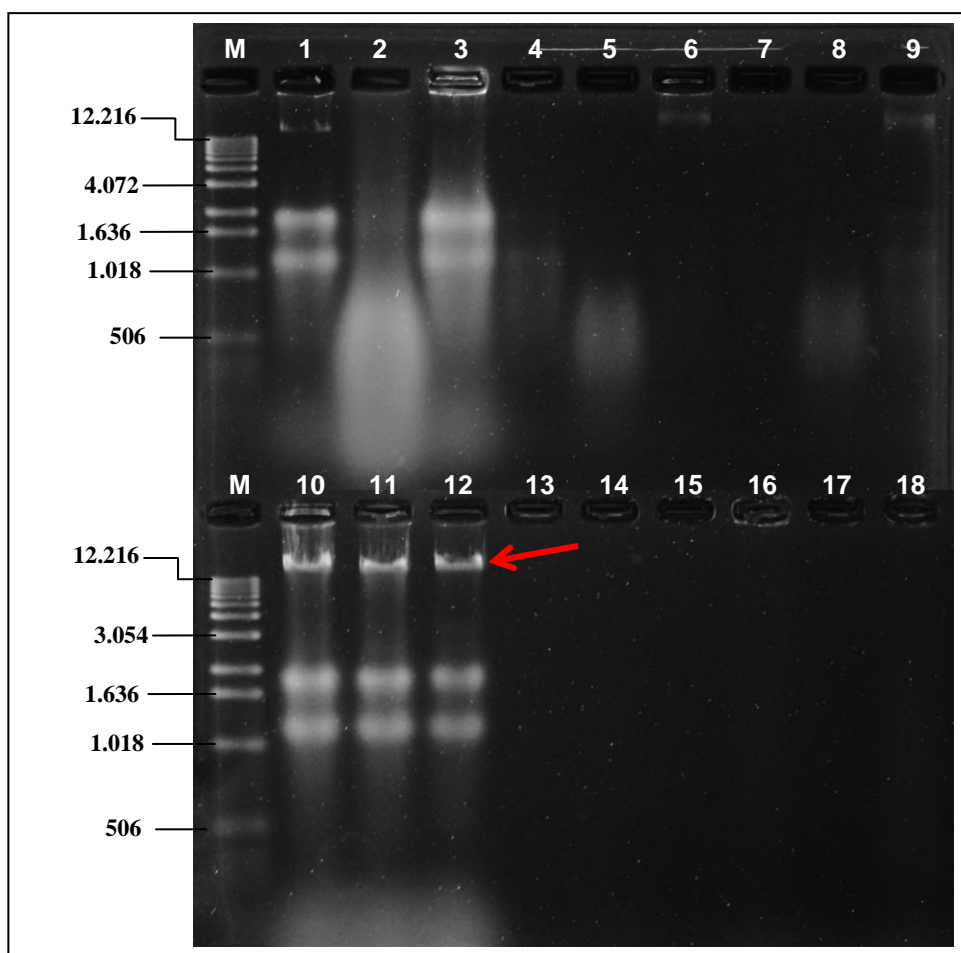
*Fonte: Registros do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos.

4.5.1 Extração de DNA

A obtenção de DNA genômico a partir de microrganismos Gram-positivos, e particularmente bactérias ácido-lácticas, pode apresentar algumas dificuldades em função da compactação e composição da parede celular destes organismos (CABEEN & JACOBS-WAGNER, 2005). A resistência mecânica desta estrutura é superior àquela observada nas bactérias Gram-negativas, e isso exige maiores esforços e métodos mais robustos para promover a lise celular. Comumente as técnicas desenvolvidas para extração de DNA de BAL incluem o emprego de agentes detergentes fortes, como CTAB (DUBERNET *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2010), resinas iônicas (GIRAFFA *et al.*, 2000; ROSSETI & GIRAFFA, 2005), pérolas de vidro compostas de zircônio (DELBES *et al.*, 2007; KAHALA *et al.*, 2008), enzimas que promovem lise celular como lisozima (ANDERSON & MCKAY, 1983;

AZCÁRATE-PERIL & RAYA, 2001) ou ainda agentes desproteinizantes, como proteinase K (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007). A presença de exopolissacarídeos, oriundos do metabolismo de algumas BAL, pode também interferir e, por sua vez, dificultar ainda mais o procedimento de extração de DNA (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007). Assim, inicialmente foi determinado o melhor método de extração para obtenção de DNA genômico para as reações de amplificação. Foram avaliadas cinco técnicas de extração, conforme descrito previamente em Métodos (item 3.6.1), e os resultados, após corrida eletroforética, podem ser visualizados através da Figura 18.

Figura 18 - Comparativo dos produtos de extração de DNA genômico de bactérias lácticas nos diferentes métodos testados.



Legenda: (M) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (1; 2; 3) Extração segundo AZCÁRATE-PERIL & RAYA (2001) para BAL n. 95, 129 e 224, respectivamente; (4 – 9) Extração com chelex 5% segundo ROSSETI & GIRAFFA (2005), para BAL n. 27, 37, 40, 95, 129 e 224, respectivamente; (10; 11; 12) Extração pelo método MSOP proposto por MARTÍN-PLATERO *et al.* (2007) para as BAL n. 27, 37 e 40, respectivamente; (13 – 18) Extração pelo método Uréia-SDS-NaOH, proposto por SINGH & RAMESH (2009), para as BAL n. 27, 37, 40, 95, 129 e 224, respectivamente.

A qualidade dos produtos de extração variou em função da técnica empregada, para linhagens em comum. Para a primeira técnica avaliada (linhas nº 1, 2 e 3), constatou lise celular e liberação de material genético, porém de baixa qualidade e, especialmente na linha nº 2, verifica-se grande quantidade de DNA genômico fragmentado e possivelmente misturado a contaminantes (RNA). Este resultado permite observar que o procedimento de sonicação aplicado nesta amostra quebrou em excesso o DNA, possivelmente devido ao tempo de sonicação empregado. A segunda metodologia avaliada (compreende as linhas nº 4 a 9) fez uso de uma resina iônica denominada chelex[®] (ácido iminodiacético) capaz de ligar-se a componentes inibitórios a reação de PCR liberados junto ao *debris* celular. A proposta desta técnica é atuar como um procedimento rápido e de fácil execução que permita simplificar a etapa de extração de DNA bacteriano, se comparado ao tradicional método de extração por fenol-clorofórmio (GIRAFFA *et al.*, 2000). Apesar dos autores recomendarem a reprodução desta técnica para BAL, como uma alternativa válida aos procedimentos tradicionais, no presente estudo não foram observados resultados reprodutíveis para as diferentes cepas. Pelas linhas nº 6 e 9 é possível constatar a presença de DNA genômico caracterizado pela formação de uma banda na parte superior do gel, porém com baixo rendimento. Já nas linhas nº 4, 5 e 8, ainda correspondentes a esta técnica, observou-se lise celular porém visualiza-se intensa fragmentação do DNA genômico. Na linha nº 7, não houve ruptura da membrana citoplasmática.

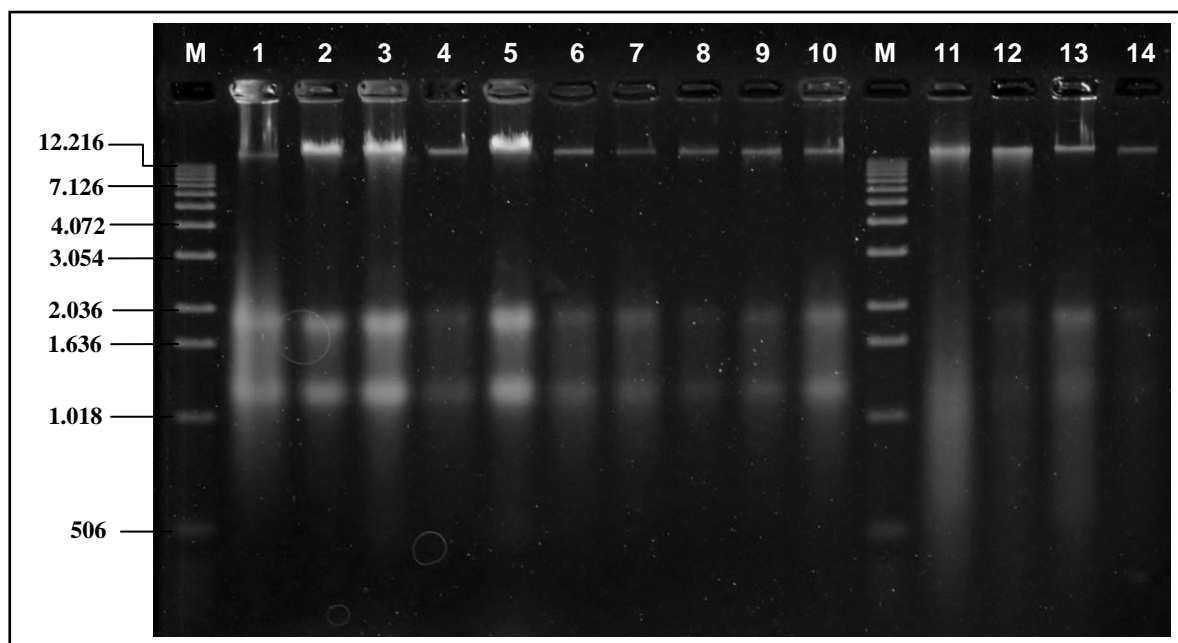
Outros dois métodos de extração foram ainda avaliados e estão apresentados na parte inferior da Figura 18. Um destes métodos não promoveu quaisquer efeitos danosos à estrutura celular das bactérias Gram-positivas e por isso nenhum material genético foi observado. Estes resultados referem-se ao método de extração por Uréia-SDS-NaOH (linhas nº 13 a 18), proposto por Singh & Ramesh (2009). Por outro lado, o método denominado pelos autores como MSOP (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007), aplicado inicialmente para três linhagens de BAL (linhas nº 10, 11 e 12), demonstrou resultados bastante satisfatórios quanto à qualidade, quantidade e uniformidade de material genético extraído, facilmente identificado pela formação da banda superior bem definida (seta indicativa na Figura 18) que representa o DNA genômico.

O método MSOP tem por base um procedimento adaptado de “*salting-out*” para extração de DNA, e consiste basicamente de três etapas: i) suspensão das

células em solução tampão enzimática composta por lisozima; ii) promoção da lise bacteriana das células tratadas por ação de um tampão de lise (100 mM Tris–HCl [pH 8.0], 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS) e solução de proteinase K, com subsequente desnaturação das proteínas por aquecimento; e iii) precipitação das proteínas usando solução com alta concentração de sais (acetato de sódio a 3,0 M). Etapas posteriores de precipitação e centrifugação com isopropanol e etanol permitiram a precipitação do DNA extraído. Não foram necessárias aplicações de solventes orgânicos (como fenol e clorofórmio) ou outros agentes desnaturantes, porque o DNA obtido encontrava-se desproteínizado pela ação do SDS e dos sais, que agiram sobre as proteínas liberadas no *debris* celular. Este método foi validado para a extração de DNA genômico de mais de 500 linhagens de BAL de diferentes gêneros (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*), além de outras bactérias Gram-positivas (*Micrococcus*, *Kocuria* e *Corynebacterium*) (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007). Além disso, configurou-se como um procedimento simples, rápido e sem requerer equipamentos ou “kits” de extração de custo elevado, por isso foi adequado às finalidades deste estudo.

A partir da escolha do método MSOP como padrão para as extrações, todas as demais linhagens de BAL foram submetidas ao mesmo procedimento para extração de DNA. O material genético das bactérias indicadoras Gram-negativas também foi obtido através desta metodologia. Na Figura 19 estão representados os produtos de extração de todas as linhagens trabalhadas neste estudo.

Figura 19 - DNA genômico extraído através do método MSOP para todas as amostras.



Legenda: (M) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (1 – 10) DNA genômico das bactérias lácticas n. 24, 27, 37, 38, 40, 43, 61, 95, 129 e 224, respectivamente; (11 – 14) DNA cromossômico das bactérias indicadoras, na ordem: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.5.2 Concentração e pureza do DNA cromossomal

Determinações quantitativas da concentração e pureza do DNA cromossomal, obtido através das extrações pelo método MSOP, foram realizadas por espectrofotometria e permitiram o reconhecimento das quantidades necessárias para a etapa de amplificação, para cada amostra, bem como representam uma avaliação do método de extração proposto por Martín-Platero *et al.* (2007). Os resultados estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Análise de concentração e pureza do DNA cromossomal após extrações.

Classe	Linhagem	Concentração (µg/mL)	Pureza (260/280nm)
Isolados de bactérias lácticas selecionados na triagem	BAL 024	350,0	2,0
	BAL 027	995,0	2,1
	BAL 037	2.020,0	2,1
	BAL 038	425,0	2,0
	BAL 040	2.240,0	2,0
	BAL 043	375,0	2,0
	BAL 061	345,0	2,0
	BAL 095	235,0	1,9
	BAL 129	300,0	2,0
	BAL 224	690,0	2,0
Bactérias lácticas de referência	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121	190,0	2,0
	<i>Lactobacillus curvatus</i> ATCC 51436	160,0	2,0
	<i>Lactobacillus reuteri</i> *	1.860,0	2,0
	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	1.970,0	2,0
Bactérias Gram-negativas indicadoras de atividade antimicrobiana	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1.420,0	1,8
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	765,0	1,8
	<i>Escherichia coli</i>	1.040,0	1,8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	650,0	1,8

**Lactobacillus reuteri*: cepa previamente identificada por PANCHENIAK (2005).

A leitura da absorbância a 260nm permite quantificar os ácidos nucleicos presentes na amostra de análise, considerando que 1,0 UAb (unidade de absorbância) correspondem a 50 µg/mL ou 50 ng/µL de DNA, ou ainda 40 µg/mL para a quantificação de RNA. Alguns dos produtos de extração das linhagens de BAL analisadas demonstraram alta concentração de DNA cromossomal (BAL 027, 037, 040, *L. reuteri* e *L. sakei* ATCC 15521), enquanto para a maioria das linhagens, em média, a concentração foi próxima a 340,0 µg/mL. Estas diferenças devem estar ligadas a características intrínsecas de resistência à lise em cada linhagem, e também podem ter sofrido influência dos diferentes procedimentos de extração, que apesar de pertencerem ao mesmo protocolo, podem possuir pequenas variações,

como, por exemplo, a densidade celular inicial do cultivo. As concentrações de DNA observadas em espectrofotômetro foram coerentes com a quantificação realizada em gel, onde a intensidade de fluorescência é maior para as BAL 027, 037 e 040 (Figura 19 – linhas nº 2, 3 e 5). Assim, foi possível detectar a presença de DNA em quantidade satisfatória em todas as amostras, permitindo avançar para a etapa seguinte de amplificação.

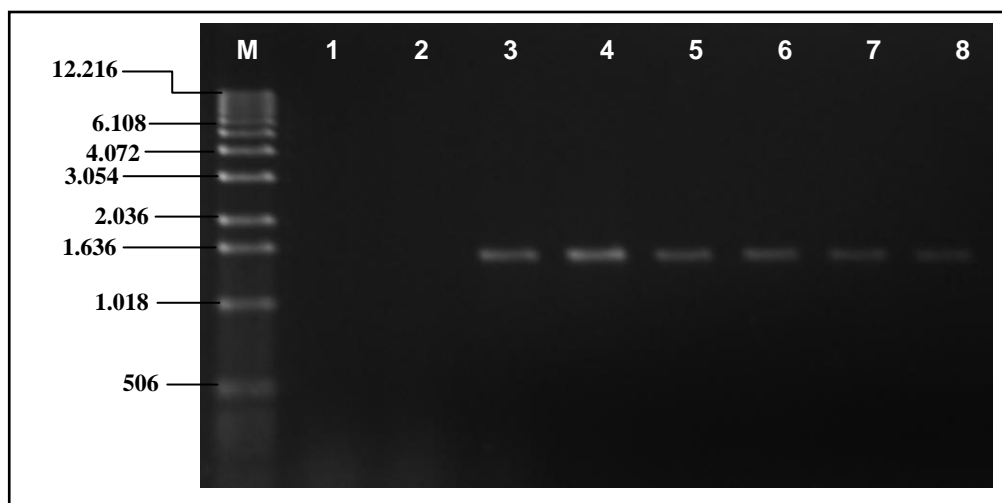
O índice de pureza do material genético é avaliado pela razão entre as leituras de absorbância a 260nm e 280nm. Amostras com alta pureza de DNA devem apresentar esta razão como $\geq 1,8$, indicando baixa contaminação por proteínas. Todas as amostras demonstraram índice satisfatório de pureza, sendo as bactérias Gram-negativas com índice igual a 1,8; e as bactérias lácticas em geral, com pureza superior a 1,8. Dessa forma, estima-se que a precipitação das proteínas com acetato de sódio, durante a extração, foi eficientemente realizada. Por outro lado, valores de pureza superiores a 2,0 podem indicar excesso de ácido ribonucléico (RNA) na amostra, como observado nas BAL 027 e 037.

Como avaliação global do método de extração, é possível afirmar que representa uma técnica eficiente de extração de DNA de bactérias lácticas, e por consequência, de bactérias Gram-negativas, e que o material genético obtido é de boa qualidade, parâmetro confirmado pela pureza.

4.5.3 Amplificação do gene 16S rDNA

Antecipadamente aos procedimentos de amplificação do material genético extraído em todas as amostras, foi realizada uma otimização da quantidade de DNA molde requerido para as reações de PCR utilizando como modelo apenas o DNA de *Salmonella* Typhimurium, avaliado sob diferentes proporções de diluição na reação de PCR, conforme descrito em Métodos (item 3.6.3). Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese horizontal para registro dos resultados, demonstrados através da Figura 20.

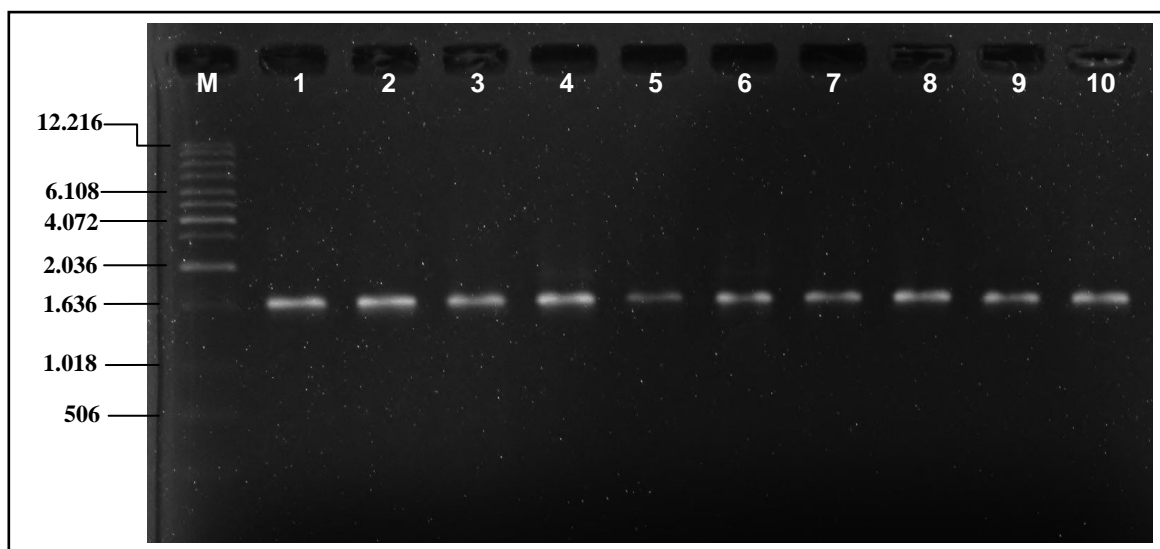
Figura 20 - Determinação da quantidade ideal de DNA molde de *Salmonella* Typhimurium para reação de PCR.



Legenda: (M) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (1) DNA molde sem diluição; (2) DNA molde diluição 3:4; (3) DNA molde diluição 1:2; (4) DNA molde diluição 1:5; (5) DNA molde diluição 1:10; (6) DNA molde diluição 1:20; (7) DNA molde diluição 1:50; (8) DNA molde diluição 1:100.

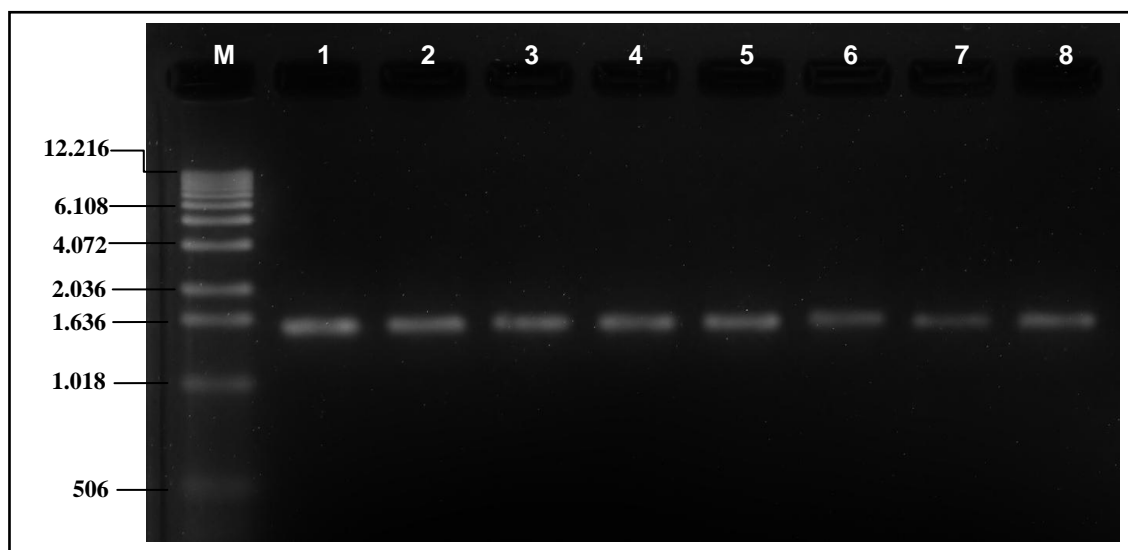
A documentação do gel de eletroforese revelou que as duas primeiras concentrações de DNA (linhas nº 1 e 2) não permitiram a amplificação, possivelmente em virtude do excesso de material genético. A partir da diluição 1:2 (linha nº 3), foi possível constatar a presença de uma banda específica de aproximadamente 1.500 pb, que representa o fragmento desejado. A diluição de 1:5 (linha nº 4) resultou na maior concentração de produto de PCR, observado pela maior intensidade de fluorescência após coloração com brometo de etídio dentre todos os tratamentos e, por isso, foi determinada como a concentração ideal para as reações de amplificação do DNA de *S. Typhimurium*. O procedimento de otimização da quantidade de DNA molde foi proporcionalmente reproduzido para as demais amostras, usando como base uma relação entre a concentração medida em cada amostra (Tabela 22) e a diluição supostamente requerida a partir dos resultados observados para *S. Typhimurium*. Dessa maneira, foi possível obter material amplificado para todas as linhagens em estudo. Os registros das bandas de material amplificado por PCR estão dispostos nas Figuras 21 e 22.

Figura 21 - Amplificação da região 16S rRNA das bactérias lácticas.



Legenda: (M) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (1 – 10) Produto de PCR das bactérias lácticas n. 24, 27, 37, 38, 40, 43, 61, 95, 129 e 224, respectivamente.

Figura 22 - Amplificação da região 16S rRNA das bactérias indicadoras Gram-negativas e das bactérias lácticas de referência.

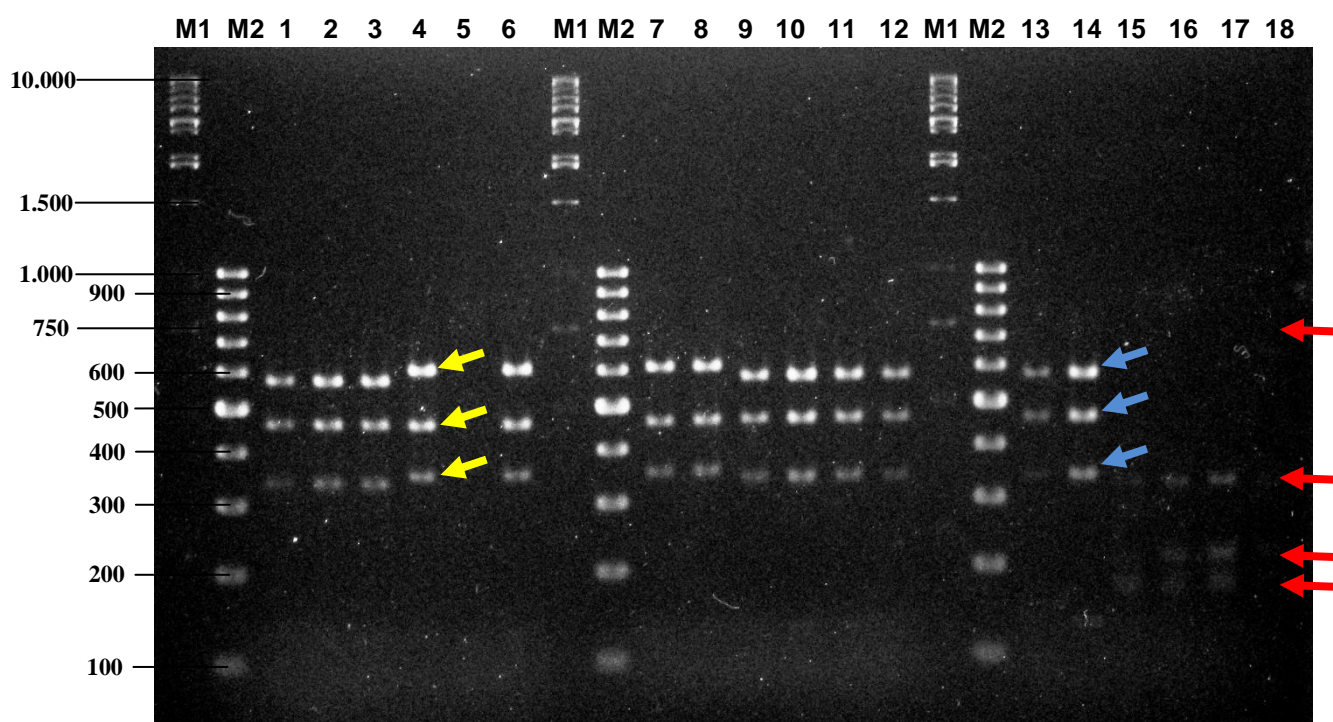


Legenda: (M) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (1 - 4) Produto de PCR das bactérias indicadoras: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente; (5 – 8) Produto de PCR das bactérias lácticas de referência, na ordem: *Lactobacillus reuteri* (PANCHENIAK, 2005), *L. acidophilus* ATCC 43121, *L. sakei* ATCC 15521, *L. curvatus* ATCC 51436.

4.5.4 Análise dos fragmentos de restrição do gene 16S-ARDRA

A análise ARDRA foi utilizada como ferramenta molecular para promover o agrupamento e/ou diferenciação entre os dez isolados de BAL selecionados e as bactérias indicadoras Gram-negativas, conforme suas similaridades genéticas. Os ensaios de restrição usando as enzimas *Pst*I e *Alu*I não clivaram o DNA de nenhuma das linhagens, por isso impossibilitaram qualquer avaliação posterior. Já a enzima de restrição *Sau*3AI foi capaz de atuar sobre os materiais genéticos amplificados, gerando fragmentos distintos entre as bactérias lácticas e as bactérias Gram-negativas, porém sem apresentar polimorfismo dentro dos grupos. Dessa maneira, ficou evidente somente a diferenciação entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como já era esperado. Perfis de restrição polimórficos foram observados então após a coloração do material genético resultante da digestão com a enzima *Hae*III, conforme apresentado na Figura 23.

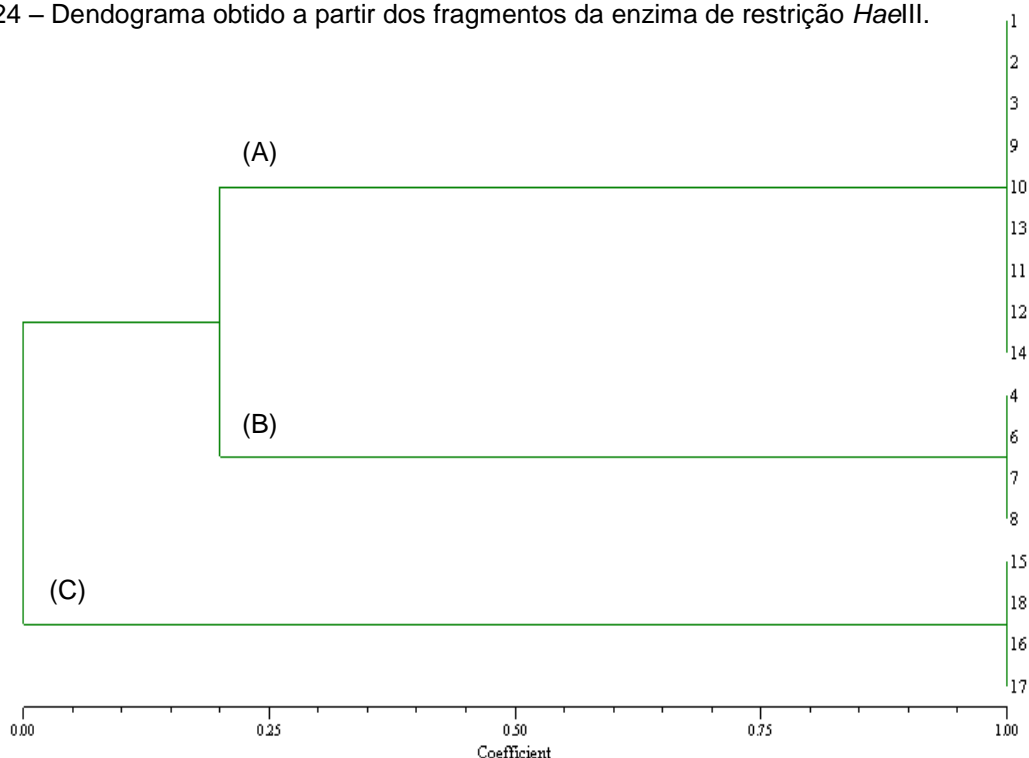
Figura 23 – Perfis de restrição para a enzima *Hae*III sobre bactérias lácticas e Gram-negativas.



Legenda: (M1) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 1kb DNA Ladder); (M2) Marcador molecular expresso em pb (Invitrogen® 500 pb DNA Ladder); (1 - 10) Fragmentos de restrição dos isolados de bactérias lácticas, na ordem: BAL 024, 027, 037, 038, 040, 043, 061, 095, 129 e 224; (11 - 14) Fragmentos de restrição das bactérias lácticas de referência, na ordem: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *L. curvatus* ATCC 51436, *L. reuteri* (PANCHENIAK, 2005), *L. sakei* ATCC 15521; (15 - 18) Fragmentos de restrição das bactérias indicadoras, na ordem: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A ação da enzima *HaeIII* gerou fragmentos distintos entre os isolados de BAL, permitindo diferenciá-los em dois grupos. O primeiro grupo compreende os resultados das linhas n. 1, 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 e se caracteriza por apresentar três fragmentos que contém tamanhos aproximados de ~580 pb, ~490 pb e ~360 pb (sinalizados por setas azuis). Já os resultados observados nas linhas n. 4, 6, 7 e 8 possuem fragmentos de aproximadamente ~610 pb, ~490 pb e ~370 pb (sinalizados por setas amarelas). Não foram obtidos fragmentos resultantes da digestão desta enzima sobre o material genético da BAL n. 040 (linha n. 5). Com esses dados foi possível discriminar um grupo de BAL composto pelos isolados n. 024, 027, 037, 129 e 224, que se assemelharam às linhagens lácticas de controle, representadas por diferentes espécies de *Lactobacillus* spp.; dos demais isolados n. 038, 043, 061 e 095. As bactérias indicadoras Gram-negativas configuraram novamente um perfil distinto caracterizado por fragmentos de aproximadamente ~700pb, ~350pb, ~220pb e ~180pb (sinalizados pelas setas vermelhas). Estas informações foram interpretadas através de um gráfico em formato de árvore de classificação ou dendograma, ilustrado na Figura 24.

Figura 24 – Dendograma obtido a partir dos fragmentos da enzima de restrição *HaeIII*.



Legenda: (1 – 10) Isolados de bactérias lácticas, na ordem: BAL 024, 027, 037, 038, 040, 043, 061, 095, 129 e 224; (11 – 14) Bactérias lácticas de referência, na ordem: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *L. curvatus* ATCC 51436, *L. reuteri* (PANCHENIAK, 2005), *L. sakei* ATCC 15521; (15 – 18) Bactérias indicadoras, na ordem: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os microrganismos pertencentes aos grupos A e B, da Figura 24, demonstraram um coeficiente de similaridade igual a 0,2, correspondente a 20%. Ambos são compostos pelos isolados lácticos em avaliação e, juntamente ao grupo A, estão compreendidos os *Lactobacillus* spp. de referência. Sugeriu-se assim que os isolados pertencentes a este grupo (A) compartilhavam da mesma classificação em termos de gênero e, ao mesmo tempo, diferenciaram-se dos isolados pertencentes ao grupo B, possivelmente composta por outro gênero de bactérias lácticas. Conforme esperado, o dendograma demonstra que não houve qualquer similaridade entre os grupos A ou B com o grupo C, composto pelas bactérias Gram-negativas.

4.5.5 Análise de seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento genético foi procedido a partir de uma linhagem de BAL representativa escolhida randomicamente de cada perfil polimórfico, conforme observado na análise dos fragmentos de restrição da enzima *HaeIII*, e obrigatoriamente para a BAL 027, linhagem de maior interesse neste estudo. Os resultados da identificação molecular estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Identificação molecular de isolados selecionados de bactérias lácticas.

Classificação	Isolados		
	BAL 027	BAL 038	BAL 224
Domínio	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Classe	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Ordem	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Família	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae
Gênero	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Espécie mais próxima	<i>Lactobacillus plantarum</i> , Chikuso-1 (S_ab: 0,989)*	<i>Pediococcus acidilactici</i> BFE 8245 (S_ab: 0,98)*	<i>Lactobacillus plantarum</i> , AB104855 (S_ab: 0,9)*
* Escore de similaridade: valor percentual de identidade da seqüência analisada em relação ao banco de seqüências ribossomais do RDP (<i>Ribosomal Database Project</i>), sendo que a espécie mais próxima corresponde ao melhor pareamento obtido.			

O seqüenciamento genético revelou que ambas as linhagens 027 e 224 correspondem a *Lactobacillus plantarum*, com 98% e 90% de confiança, respectivamente, conforme escore de similaridade. Esta espécie é rotineiramente relacionada à produção de bacteriocinas denominadas “plantaracinas” e é reportada por uma vasta quantidade de pesquisadores (RUIZ-BARBA *et al.*, 2010; ROJO-BEZARES *et al.*, 2007; TODOROV *et al.*, 1999; TODOROV *et al.*, 2007; TODOROV *et al.*, 2011; LEAL-SÁNCHEZ *et al.*, 2002; MESSI *et al.*, 2001; HATA, TANAKA & OHMONO, 2010; XIE *et al.*, 2011; GONG, MENG & WANG, 2010). Já a linhagem 038 ficou identificada como *Pediococcus acidilactici*, com 98% de confiança, e também já possui pesquisas envolvendo bacteriocinas provenientes destas espécies, que são chamadas “pediocinas” (SIVAKUMAR *et al.*, 2010; ALBANO *et al.*, 2007; ANASTASIADOU *et al.*, 2008; ELEGADO *et al.*, 1997; NIETO-LOZANO *et al.*, 2010).

5 CONCLUSÕES

- Dentre 272 linhagens de bactérias lácticas, leveduras e bacilos avaliados, 39 culturas de bactérias lácticas demonstraram potencial para a síntese de compostos antimicrobianos, sendo que destas, 10 linhagens apresentaram maior regularidade na produção dos compostos de interesse.
- O emprego de EDTA nos ensaios antimicrobianos até a concentração de 0,055 mM não foi inibitório ao crescimento da bactéria indicadora e favoreceu a ação biológica de todos os extratos avaliados, que apresentaram índices de inibição mais efetivos sobre as células-alvo.
- As bactérias indicadoras Gram-negativas não demonstraram resistência adquirida a nenhuma das drogas antibióticas avaliadas, porém foram sensíveis ao tratamento com a bacteriocina nisina, em diferentes níveis de concentração.
- A fermentação em co-cultivo foi a condição que melhor favoreceu a produção de compostos antimicrobianos, dentre as condições ambientais de indução estudadas.
- A bactéria láctica 027 foi a única linhagem que apresentou índices de inibição superiores a 50% sobre as cinco bactérias indicadoras avaliadas.
- A cinética de fermentação da BAL 027 em co-cultivo com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 revelou que a concentração de compostos antimicrobianos no caldo de fermentação foi maior entre o período final da fase logarítmica e a fase estacionária do crescimento bacteriano.
- Os biocompostos ativos produzidos pela BAL n. 027 possuem estrutura protéica, supostamente ligada a cadeias laterais glicídicas e lipídicas, tolerante ao pH ácido e sensível ao pH alcalino, parcialmente sensível ao tratamento térmico e com tamanho molecular próximo a 3,0 kDa, caracterizando-se como um peptídeo antimicrobiano.
- A análise de restrição do DNA ribossomal (16S-ARDRA) com a enzima *HaeIII* revelou polimorfismo dentre os isolados de bactérias lácticas selecionados, que após o seqüenciamento genético ficaram reconhecidos como *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp.
- A identificação molecular permitiu reconhecer a BAL n. 027 e n. 224 como *Lactobacillus plantarum*, e a BAL n. 038 como *Pediococcus acidilactici*.

REFERÊNCIAS

ABIPECS, Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em ABR, 2011.

ABRAMS, D.; BARBOSA, J.; ALBANO, H.; et al. Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 940-946, 2011.

AGE/MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20**. Brasília, 2010.

ALBANO, H.; TODOROV, S. D.; REENEN, C. A VAN; et al. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 239-47, 2007.

ALLISON, G.E.; KLAENHAMMER, T.R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria and Their Use in Novel Industrial Applications. *In*: DEMAIN, A.L.; DAVIES, J.E. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2nd ed. Washington: ASM Press, chap. 63, p. 789-808, 1999.

ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P.; ÁVILA, F. A. Diarréia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **ARS Veterinaria**, v. 23, n. 3, p. 151-157, 2007.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility - Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, p. 454-461, 2006.

ANASTASIADOU, S.; PAPAGIANNI, M.; FILIOUSIS, G.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5384-90, 2008.

ANDERSON, D. G.; MCKAY, L. L. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic *Streptococci*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 549-552, 1983.

ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application : a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.

AZCÁRATE-PERIL, M.A.; RAYA, R.R. Methods for Plasmid and Genomic DNA Isolation. *In*: SPENCER, J.F.T.; SPENCER, A.L.R. **Food Microbiology Protocols - Methods in Biotechnology**, v. 14, p. 135-139, 2001.

BARRETO, M. S. R. **Uso de extratos vegetais como promotores do crescimento em frangos de corte**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo, 2007.

BORIS, S.; BARBÉS, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 543-546, 2000.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 63 – 74, 2004.

BRASHEARS, M.M.; AMEZQUITA, A.; JARONI, D. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. In: TAYLOR, S. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 50, p. 2-25, 2005.

BRASIL. Instrução normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Instrução normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Legislação MERCOSUL/GMC/RES Nº 82/96. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Ministério da Saúde. **Boletim de Integração Latino-Americana**, n. 19, jul/dez 1996.

BRASIL. Legislação MERCOSUL/GMC/RES Nº. 79/94. Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Boletim de Integração Latino-Americana**, n. 15, out/dez 1994.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition : Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.

BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; et al. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho , incidência de diarreia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, p. 59-67, 2006.

CABEEN, M.T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 601-610, 2005.

CARDOZO, E. DE C. **Utilização de probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, 2006.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 159-161, 2003.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; VIGNOLO, G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157 : H7 in frozen ground-beef patties. **Food Control**, v. in press, p. 7-11, 2011.

CASTELLANO, P.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. Mode of action of lactocin 705 , a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 35 - 43, 2003.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 82-100, 2003.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI document M100-S20, v. 30. Wayne, PA: Clinical Laboratories Standards Institute, 2010.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. **Current Protein and Peptide Science**, n. 6, v. 1, p. 61-75, 2005.

DAESCHEL, M.A.; JUNG, D-S.; WATSON, B.T. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 601-603, 1991.

DELBES, C., ALI-MANDJEE, L., MONTEL, M. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1882–1891, 2007.

DOBSON, A. E.; SANOZKY-DAWES, R. B.; KLAENHAMMER, T. R. Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1766-1778, 2007.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D. Occurrence of *Salmonella* spp. In broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 569-573, 2009.

DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUEGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 271–275, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Bioconservação de Alimentos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. São Paulo, n. 29, p. 114-119, nov./dez. 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocina formation. **Food Control**, n. 14, p. 197-200, 2003.

DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 195-199, 2003.

ECONOMOU, T.; POURNIS, N.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Nisin – EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1470-1476, 2009.

ELEGADO, F. B.; KIM, W. J.; KWON, D. Y. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 1-11, 1997.

FRANCO, L. G. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, 2009.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, MICHAEL E; BELKUM, M. J. V. Simple method to identify bacteriocin induction peptides and to auto-induce bacteriocin production at low cell density. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, p. 181-185, 2000.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S15-S28, 2010.

GÁLVEZ, A; ABRIOUEL, H; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 142-148, 2010.

GAMA, N. M. **Salmonella spp em aves de postura comercial**. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, 2001.

GIRAFFA, GIORGIO; ROSSETTI, LIA; NEVIANI, ERASMO. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p. 175-184, 2000.

GOLAN, D.E.; TASHJIAN, A.H.Jr; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Principles of pharmacology** – the pathophysiologic basis of drug therapy. 2. Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, p. 585-615, 2008.

GONG, H. S.; MENG, X. C.; WANG, H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

GULAHMADOV, S. G.; BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; *et al.* Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 229-235, 2006.

HATA, T.; TANAKA, R.; OHMOMO, S. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 94-9, 2010.

HEYNDRICKX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 3, p. 247 – 259, 1996.

JAY, J. M. Antimicrobial Properties of Diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 525-532, 1982.

KAHALA, M.; LEHTOVAARA, A.; TAPANAINEN, J.; et al. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1929-1938, 2008.

KEPPLER, K.; GEISER, R.; HOLZAPFEL, W. H. An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. **Food Microbiology**, v. 11, p. 39–45, 1994

KICH, J. D.; SCHWARZ, P.; NOGUEIRA, M. G. **Aspectos epidemiológicos da contaminação por *Salmonella* em suínos no Brasil.** p.1-6. No prelo.

KWAADSTENIET, M. D.; TODOROV, S. D.; KNOETZE, H.; DICKS, L. M. T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 433 - 444, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANE, D. J., B. PACE, G. J. OLSEN, D. A. STAHL, M. L. SOGIN, AND N. R. PACE. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LEAL-SÁNCHEZ, M. V.; JIMÉNEZ-DÍAS, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J. L. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4465-4471, 2002.

LEE, H.-J.; KIM, W. J. Isolation and Characterization of Anti-listerial and Amylase Sensitive Enterocin Producing Isolation and Characterization of Anti-listerial and Amylase Sensitive Enterocin Producing *Enterococcus faecium* DB1 from Gajam-sikhae, A Fermented Flat Fish in Kor. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 373 - 381, 2010.

LEVY, R. N.; SILVA, R. S. F.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. Ensaio fatorial de atividade inibitória de *Penicillium* por leveduras em frutos de maçãs. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 145-150, 2000.

LEWUS, C.B., SUN, S., MONTVILLE, J.T. Production of an α -amylase bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 143–149, 1992.

LIMA, G. M. DE S. **Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis***. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

LOPES, H. V. Tigeciclina : nova arma antibacteriana. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 8, n. 2, p. 45-46, 2006.

LOSTEINKIT, C.; UCHIYAMA, K.; OCHI, S.; et al. Characterization of Bacteriocin N15 Produced by *Enterococcus faecium* N15 and Cloning of the Related Genes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 390-395, 2001.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MALDONADO, A.; JIMÉNEZ-DÍAS, RUFINO; RUÍZ-BARBA, L. Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1556-1564, 2004.

MAROTI, G.; KERESZT, A.; KONDOROSI, E.; MERGAERT, P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes , plants and animals. **Research in Microbiology**, v. in press, p. 1 -12, 2011.

MARTÍN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. **Analytical Biochemistry**, v. 366, p. 102-104, 2007.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P., HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, n. 25, p. 285-308, 2001.

MESSI, P.; BONDI, M.; SABIA, C.; BATTINI, R.; MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 193 - 198, 2001.

MILLIPORE. Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Catálogo. Disponível em: <<http://www.millipore.com/catalogue/module/c7715#0>>. Acesso em: JAN, 2011.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; MANOJ, K.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v. 9, p. 190-198, 2008.

MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I. F.; CARVALHO, Y. Methodological Variations in the Isolation of Genomic DNA from *Streptococcus* Bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 845-849, 2010.

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? **Canadian Medical Association Journal**, v. 180, n. 4, p. 8, 2009.

MURIANA, P. M.; KLAENHAMMER, T. R. Purification and Partial Characterization of Lactacin F, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 114-121, 1991.

MURRAY, R. P. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed., v. 1. Washington DC: ASM, 2007.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NES, I. F.; YOON, S.-S.; DIEP, D. B. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 675 - 690, 2007.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USERO, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. D. C.; *et al.* The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 679-685, 2010.

OETTING, L. L. **Extratos vegetais como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados**. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 297 - 305, 2005.

OTHMAN, M.; SAN, H.; WIART, C.; *et al.* Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 161-166, 2011.

PANCHENIAK, E. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB-001 em suínos**. 154p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, 2005.

PARADA, JOSÉ LUIS; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; GIORDANO, W.; PÁJARO, M. C.; BARBERIS, I. L. Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. **Current Microbiology**, v. 56, p. 397-402, 2008.

PINGITORE, E. V.; SALVUCCI, E.; SESMA, F.; NADER-MACÍAS, M. E. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. A. Méndez-, n. 4000, p. 557-568, 2007.

PORTELLA, A.C.F.; SCHEIDT, G.N.; WOICIECHWSKI, A.L.; PARADA, J.L.; SOCCOL, C.R. Modelling Antagonic Effect of Lactic Acid Bacteria Supernatants on Some Pathogenic Bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 29-36, 2009.

ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; NAVARRO, L.; et al. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology**, v. 24, p. 482-491, 2007.

ROSSETTI, LIA; GIRAFFA, GIORGIO. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated , RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p. 135 – 144, 2005.

RUDNIK, L. **Controle da diarreia suína no período de aleitamento através do fornecimento de gemas de ovos de galinhas hiperimunizadas contra *Escherichia coli* suína**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

RUIZ-BARBA, JOSÉ LUIS; CABALLERO-GUERRERO, B.; MALDONADO-BARRAGÁN, ANTONIO; JIMÉNEZ-DÍAS, RUFINO. Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8 , an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. **Food Microbiology**, v. 27, p. 413-417, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis – Chapter 5. *In: Molecular Cloning – A laboratory manual*. 3rd Ed. CSHL Press: New York, 2001.

SANTINI, C.; BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; et al. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. S98-S108, 2010.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHMIDEL, W.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica, vol. 2. São Paulo: Edgar Blucher, 2001.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BATISTA, C. R. V. Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 233-237, 2005.

SHANAHAN, F. Probiotics in Perspective. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1808-1812, 2010.

SHELBURNE, C. E.; AN, F. Y.; DHOLPE, V.; et al. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 2-5, 2007.

SHIMIZU, H.; MIZUGUCHI, T.; TANAKA, E.; SHIOYA, S. Nisin Production by a Mixed-Culture System Consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3134-3141, 1999.

SILVA, C. R. **Uso de probiótico em rações de frangos de corte: desempenho, digestibilidade e energia metabolizável**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

SINGH, A. K.; RAMESH, A. Evaluation of a facile method of template DNA preparation for PCR-based detection and typing of lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 504-513, 2009.

SIVAKUMAR, N.; RAJAMANI; SAIF, A.-B. Partial Characterization of Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1177-1184, 2010.

STURME, M. H. J.; FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; VOS, W. M. D.; KLEEREBEZEM, M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Microbiology**, v. 153, p. 3939-3947, 2007.

TABBENE, O; KARKOUCH, I.; SLIMENE, I.B. *et al.* Triggering of the Antibacterial Activity of *Bacillus subtilis* B38 strain against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 34-44, 2011.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. *In*: NAIDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. New York: CRC Press, p. 463-524, 2000.

TOBA, T.; SAMANT, S. K.; ITOH, T. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 102-104, 1991.

TODOROV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 178-187, 2008.

TODOROV, S.D.; NYATI, H.; MEINCKEN, M.; DICKS, L.M.T. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. **Food Control**, v. 18, p. 656-664, 2007.

TODOROV, S.D.; ONNO, B.; SOROKINE, O.; *et al.* Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p. 167-177, 1999.

TODOROV, S.D.; PRÉVOST, H.; LÉBOIS, M.; *et al.* Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1351-1363, 2011.

TODOROV, S.D.; WACHSMAN, M.; TOMÉ, E.; *et al.* Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 869-879, 2010.

TUNÕN, P.; JOHANSON, K.E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 9, p. 171-179, 1984.

UBABEF. **Relatório Anual 2010/2011**. Sítio eletrônico da União Brasileira de Avicultura. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/>>. Acesso em MAI, 2011.

UNIÃO EUROPÉIA Jornal Oficial. **Regulamento UE nº 37**, de 22 de dezembro de 2009. Bruxelas, Bélgica: Comissão Europeia, 2010.

VAARA, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; *et al.* Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 186-94, 2009.

VANEECHOUTTE, M.; BEENHOUWER, H.; CLAEYS, G.; *et al.* Identification of *Mycobacterium* species with amplified rDNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2061 – 2065, 1993.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I.; ELAICHOUNI, A.; DE VOS, P.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 11 – 15, 1995.

VUYST, L. D.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria : Production , Purification, and Food. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 194-199. doi: 10.1159/000104752, 2007.

XIE, Y.; AN, H.; HAO, Y.; *et al.* Characterization of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1027-1031, 2011.

WHITING, R C; SACKITEY, S.; CALDERONE, S.; MORELY, K.; PHILLIPS, J. G. Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 231-243, 1996.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, 1992.

YILDIRIM, Y.; GONULALAN, Z.; PAMUK, S.; ERTAS, N. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp . on raw chicken carcasses. **Food Research International**, v. 44, p. 725-728, 2011.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. Supl 1, p. 81-86, 2008.